

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Développement d'un microréacteur à base d'enzyme protéolytique réticulée avec le
glutaraldéhyde pour la cartographie peptidique**

par

Quynh Vy Nguyen

Département de chimie, Université de Montréal

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M. Sc.)
en Chimie

Décembre 2008

© Quynh Vy Nguyen, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé
**Développement d'un microréacteur à base d'enzyme protéolytique réticulée avec le
glutaraldéhyde pour la cartographie peptidique**

présenté par
Quynh Vy Nguyen

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Kevin Wilkinson: Président-rapporteur
Pr. Karen C. Waldron : Directrice de recherche
Pr. Jean-François Masson : Membre du jury

SOMMAIRE

La cartographie peptidique utilisant une enzyme protéolytique est un outil bioanalytique souvent utilisé afin de caractériser les protéines par l'identification des anomalies d'un acide aminé constituant un peptide. Par contre, le plus gros désavantage d'une enzyme protéolytique soluble est son autoprotéolyse donnant des pics non voulus sur la carte peptidique. Afin d'éviter cela, les enzymes protéolytiques insolubles sont utilisées. La réduction du temps de digestion, sa stabilité, sa réutilisabilité et la possibilité de les mettre en format microréacteur sont d'autres avantages des enzymes insolubles.

Les travaux précédents ont démontré qu'il est possible de rendre la trypsine insoluble par réticulation polymérique avec le glutaraldéhyde. Ce travail vise de développer une telle méthode pour la chymotrypsine et de développer des microréacteurs à phase solide pour la caractérisation des protéines. Des microréacteurs de taille capillaire sont alors fabriqués, hors ligne et en ligne, par l'aminosilanisation avec le 3-aminopropyltriéthoxysilane suivie de la réticulation *in-situ* de l'enzyme avec le glutaraldéhyde afin d'obtenir, rapidement et efficacement, des cartes peptidiques reproductibles. Les cartes peptidiques de l'hémoglobine humaine obtenues par électrophorèse capillaire et quelques unes obtenues par spectrométrie de masse sont alors présentées pour évaluer leur efficacité.

Quelques études préliminaires pour l'amélioration de l'activité spécifique de la trypsine réticulée par l'utilisation de son inhibiteur réversible, le benzamidine, ainsi que des études sur la quantification du glutaraldéhyde sont aussi présentées. Les résultats obtenus prouvent qu'il a été possible de développer une méthode de réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde et que les procédures d'aminosilanisation et de réticulation d'enzyme *in-situ* proposées sont efficaces hors ligne et partiellement efficaces en ligne. Donc, plus d'études de développement sont nécessaires afin d'obtenir des cartes peptidiques efficaces en ligne.

Mots-clés: *cartographie peptidique, reticulation, glutaraldéhyde, trypsine, chymotrypsine, benzamidine, électrophorèse capillaire, spectrométrie de masse, microréacteur.*

ABSTRACT

Peptide mapping using a proteolytic enzyme is a bioanalytical tool often used to characterize proteins by identifying post-translational modifications or amino acid anomalies. However, the greatest disadvantage of a soluble proteolytic enzyme is its autoproteolysis, making the peptide map complex because of unwanted peaks. To avoid this, insoluble proteolytic enzymes are used. A reduced digestion time, increased stability, reusability as well as its use in a microreactor format are also some of the other advantages of insoluble enzyme.

Previous work has shown that it is possible to insolubilize trypsin via a polymeric reticulation with glutaraldehyde. The present research aims to develop a similar method for the crosslinking of chymotrypsin while developing simple, microscale solid-phase devices for applications in protein characterization. Therefore, capillary-sized microreactors prepared by aminosilanization using 3-aminopropyltriethoxysilane followed by *in-situ* glutaraldehyde-enzyme cross-linking were fabricated with the goal to obtain, quickly and efficiently, reproducible peptide maps. Human haemoglobin peptide maps obtained by capillary electrophoresis, as well as by mass spectrometry in a few cases, are presented in order to show its efficiency.

In order to improve the specific activity of crosslinked trypsin, benzamidine, a reversible trypsin inhibitor, was used and some preliminary results are shown. Some studies featuring the quantification of unreacted glutaraldehyde are also presented. Results obtained proved that it was possible to develop a method for the insolubilization of chymotrypsin with glutaraldehyde and that the procedures shown for the aminosilanization and the *in-situ* reticulation, inside the capillary walls, were effective offline and, partially effective, online. These studies require further investigation in order to obtain more effective peptide maps using microreactors prepared online.

Keywords: *peptide mapping, crosslinking, glutaraldehyde, trypsin, chymotrypsin, benzamidine, capillary electrophoresis, mass spectrometry, microreactor.*

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	I
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	VIII
REMERCIEMENTS.....	IX
CHAPITRE 1 Introduction et théorie	1
1.1 Protéines	2
1.2 Cartographie peptidique.....	3
1.2.1 Enzymes insolubles	3
1.2.2 Activité cinétique des enzymes.....	6
1.2.3 Techniques d'analyses des fragments peptidiques	10
1.3 Buts des études effectuées et approches expérimentales.....	14
CHAPITRE 2 Partie expérimentale	15
2.1 Produits chimiques	16
2.2 Instrumentation	17
2.2.1 Spectrophotométrie d'absorption UV.....	17
2.2.2 Electrophorèse capillaire	17
2.2.3 Spectrométrie de masse.....	18
2.2.4 Analyse de taille des particules par diffraction laser.....	18
2.3 Procédures.....	19
2.3.1 Trypsine libre	19
2.3.2 Trypsine réticulée avec le glutaraldéhyde.....	19
2.3.3 Trypsine modifiée avec l'inhibiteur benzamidine et réticulée avec le glutaraldéhyde.....	21
2.3.4 Chymotrypsine libre	22
2.3.5 Chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde	23
2.3.6 Chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde dans le microréacteur hors ligne.....	24
2.3.7 Chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde dans le microréacteur en ligne	26
2.3.8 Quantification du glutaraldéhyde	27
CHAPITRE 3 Réticulation des enzymes avec le glutaraldéhyde.....	29
3.1 Études des conditions de réticulation	30
3.1.1 pH de réticulation	31
3.1.2 Rapport molaire de GA:chymotrypsine.....	35
3.1.3 Inactivation du GA.....	38
3.2 Caractéristiques des enzymes réticulées.....	39
3.2.1 Activité catalytique des enzymes.....	39

3.2.2	<i>Morphologie des particules</i>	44
3.3	Utilisation des enzymes réticulées pour la cartographie peptidique.....	48
CHAPITRE 4 Effet du benzamidine sur l'activité catalytique de la trypsine réticulée		61
4.1	pH optimal de la réticulation.....	64
4.2	Quantification du benzamidine et de la trypsine.....	66
4.3	Évaluation de la trypsine inhibée réticulée pour la cartographie peptidique	67
CHAPITRE 5 Quantification du glutaraldéhyde.....		70
5.1	Études avec le tryptophane.....	72
5.1.2	<i>Quantification du glutaraldéhyde restant dans les lavages</i>	77
CHAPITRE 6 Développement des microréacteurs		81
6.1	Microréacteur hors ligne	82
6.1.1	<i>Avec frits</i>	82
6.1.2	<i>Immobilisation à l'aide de la silanisation</i>	86
6.2	Microréacteur en ligne	95
CHAPITRE 7 Conclusions et travaux futurs		99
CHAPITRE 8 Références		104
ANNEXES		112
Annexe A. Les 20 acides aminés naturels		113
Annexe B. Structures primaires des protéines utilisées		116
Annexe C. Méthode utilisée pour la séparation des peptides par électrophorèse capillaire		117
Annexe D. Procédure optimale de la réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde		118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Comparaison de la trypsine et de la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde lors de l'utilisation des conditions de réticulation de Migneault[50]	30
Tableau 2. Réticulation de la chymotrypsine à différents pH.....	32
Tableau 3. Détermination du rendement de réticulation de la chymotrypsine au pH 5.5 en utilisant l'absorbance mesurée à $\lambda=291.4$ nm des lavages de la réticulation	35
Tableau 4. Comparaison des activités spécifiques de la trypsine libre et réticulée à pH 8.0[22].....	40
Tableau 5. Comparaison des activités spécifiques de la chymotrypsine libre et réticulée	43
Tableau 6. Distribution de taille des particules de trypsine et de chymotrypsine réticulées	47
Tableau 7. Peptides obtenus lors de la digestion du HbA (chaîne α) par la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde 1:25 p/p	53
Tableau 8. Peptides obtenus lors de la digestion du HbA (chaîne β) par la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde 1:25 p/p	54
Tableau 9. Reproductibilité des temps de migration CZE pour quelques pics des cartes peptidiques de trois aliquots différents de HbA dénaturée.....	56
Tableau 10. Reproductibilité des temps de migration CZE pour quelques pics des cartes peptidiques de la même digestion de HbA dénaturée.....	57
Tableau 11. Peptides obtenus lors de la digestion du HbA (chaîne α) par la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde 1:5 p/p.....	58
Tableau 12. Peptides obtenus lors de la digestion du HbA (chaîne β) par la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde 1:5 p/p.....	59
Tableau 13. Inhibition compétitive de la trypsine par des amidines[66]	63
Tableau 14. Inhibition de la trypsine par le benzamidine	64
Tableau 15. Inhibition et réticulation de la trypsine dans différentes solutions tampons et à différents pH pour un rapport trypsine:benzamidine de 1:900	65
Tableau 16. Quantité de groupements aldéhydes non réagis sur la chymotrypsine réticulée.....	76
Tableau 17. Quantité de glutaraldéhyde restant dans les lavages.....	78
Tableau 18. Différentes conditions examinées pour l'immobilisation de la chymotrypsine aux parois du capillaire de silice fondue ($L_1 = 20$ cm, d.i. = 530 μ m)	91
Tableau 19. Microréacteurs avec combinaisons de conditions utilisées.....	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Triade catalytique de la chymotrypsine[1]	2
Figure 2. Structure du glutaraldéhyde.....	4
Figure 3. Schéma illustrant les digestions protéiques en ligne[36]	6
Figure 4. Diagramme du montage de la digestion dans le microréacteur de trypsine immobilisée sur des billes de verres poreuses (CPG)[17]	7
Figure 5. Courbe de Michaelis-Menten[38]	8
Figure 6. Diagramme de l'électrophorèse capillaire[49]	11
Figure 7. Structure d'un dipeptide	12
Figure 8. Désorption laser avec matrice (MALDI)[51]	13
Figure 9. Analyseur temps d'envol[52]	14
Figure 10. Montage du microréacteur hors ligne.....	25
Figure 11. Spectres (4 ^e dérivée) d'absorption des solutions étalons de la chymotrypsine dans une solution tampon de pH 5.5.....	33
Figure 12. Courbes d'étalonnage de la chymotrypsine dans une solution tampon de pH 5.5 pour la détermination du rendement	34
Figure 13. Temps observé pour obtenir un précipité selon le rapport glutaraldéhyde:chymotrypsine dans une solution tampon de CH ₃ COOH/CH ₃ COONa au pH 5.5	36
Figure 14. Rendement de la réticulation de la chymotrypsine selon le rapport glutaraldéhyde:chymotrypsine.....	37
Figure 15. Effet du pH sur l'activité enzymatique relative de la trypsine libre (■), la trypsine réticulée avec le GA (▲) et la CPG-GA-trypsine (○)[22]	40
Figure 16. Effet du pH sur l'activité enzymatique relative de la chymotrypsine libre (■) et la chymotrypsine réticulée avec le GA (▲)	42
Figure 17. Photo de la trypsine réticulée avec le glutaraldéhyde (agrandie 25 X)	44
Figure 18. Photo de la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde (agrandie 20 X)	45
Figure 19. Distribution de taille des particules (d _z) de trypsine réticulée avec le glutaraldéhyde déterminée par diffraction laser	46
Figure 20. Distribution de taille des particules (d _z) de chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde déterminée par diffraction laser	47
Figure 21. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la trypsine libre 1:25 p/p dans une solution tampon de NH ₄ HCO ₃ 50 mM pH 8.0 à 37°C pendant 4 h (A : avec substrat (HbA), B : sans substrat (blanc)); conditions de séparation : solution tampon de NaH ₂ PO ₄ 50 mM pH 2.5, V _{app} = 15 kV, L _t = 60 cm et L _d = 50 cm.....	49

Figure 22. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la trypsine réticulée 1:25 p/p dans une solution tampon de NH_4HCO_3 50 mM pH 8.0 à 37°C pendant 4 h (A : avec substrat (HbA), B : sans substrat (blanc)); conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm...49

Figure 23. Électrophérogramme de HbA non digérée 8 mg/mL; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm50

Figure 24. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la chymotrypsine libre 1:25 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h (A : avec substrat (HbA), B : sans substrat (blanc)); conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm51

Figure 25. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la chymotrypsine réticulée 1:25 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h (A : avec substrat (HbA), B : sans substrat (blanc)); conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm51

Figure 26. Cartes peptidiques de trois aliquots différents de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la chymotrypsine réticulée 1:5 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm.....55

Figure 27. Cartes peptidiques d'une même digestion de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la chymotrypsine réticulée 1:5 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm.....56

Figure 28. Cartes peptidiques de deux digestions de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par deux préparations différentes de chymotrypsine réticulée 1:5 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm57

Figure 29. Structure du benzamidine62

Figure 30. Schéma montrant le comportement des amidines aromatiques envers le site actif de la trypsine. Les lignes de contour avec les valeurs respectives de K_i indiquent les exigences stériques du site actif[66].....63

Figure 31. Électrophérogramme de la séparation du benzamidine de la trypsine dans une solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5 avec un potentiel appliqué de 15 kV[55] (A : trypsine 3 mg/mL, B : benzamidine 18.89 mg/mL et C : trypsine 3 mg/mL et benzamidine 18.89 mg/mL).....66

Figure 32. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée dans une solution tampon de NH_4HCO_3 50 mM pH 8.0 à 37°C pendant 4 h par la trypsine inhibée et réticulée 1:25 p/p au pH 8.5[55] (A : avec substrat, B : sans substrat), conditions de

séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm68

Figure 33. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée dans une solution tampon de NH_4HCO_3 50 mM pH 8.0 à 37°C pendant 4 h par la trypsine inhibée et réticulée 1:25 p/p au pH 10.5[55] (A : avec substrat, B : sans substrat), conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm68

Figure 34. Structure du tryptophane à pH neutre.....72

Figure 35. Schéma des réactions avec le tryptophane (Trp) pour la quantification du glutaraldéhyde (GA)73

Figure 36. Électrophérogramme de la séparation de l'alanine-phénylalanine 21.5 mM du tryptophane 4.88 mM dans une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM pH 5.5, conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm74

Figure 37. Courbe d'étalonnage du tryptophane dans une solution tampon75

Figure 38. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine réticulée 1:25 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h. A : arrêt de la réticulation par la glycine; B : arrêt de la réticulation par le tryptophane, conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm77

Figure 39. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine réticulée dans le microréacteur dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm. Écoulement à 20 psi d'Ar appliqué donnant une période de digestion de <10 s.....83

Figure 40. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine réticulée dans le microréacteur dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm. Écoulement à 5 psi d'Ar appliqué.....84

Figure 41. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine réticulée dans le microréacteur dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C pendant 24 h sans écoulement; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm.....85

Figure 42. Structures de 3-aminopropyltriéthoxysilane (3-APTS), N-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyltriméthoxysilane (EDA) et (3-triméthoxysilylpropyl) diéthylènetriamine (DETA)[83]87

Figure 43. Deux mécanismes possibles de l'immobilisation d'une protéine par le glutaraldéhyde et le 3-APTS[56]90

Figure 44. Cartes peptidiques de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine immobilisée dans les microréacteurs 1-5 dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M

avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C à 2 psi; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm92

Figure 45. Cartes peptidiques de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine immobilisée dans les microréacteurs 1-4 dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C pendant 24 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm.....93

Figure 46. Cartes peptidiques de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine immobilisée dans les microréacteurs 1-3 dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C pendant 4 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm.....94

Figure 47. Cartes peptidiques de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine immobilisée dans les microréacteurs 1-3 dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C pendant 24 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm.....94

Figure 48. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine réticulée et immobilisée dans le microréacteur en ligne dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 50 psi pendant 1 minute à 25°C; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm96

Figure 49. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine immobilisée dans le microréacteur en ligne dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 pendant 4 h à 25°C; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm.....97

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

3-APTS	3-Aminopropyltriéthoxysilane
BAEE	Ester d'éthyle de benzoyl-L-arginine (Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester)
BTEE	Ester d'éthyle de <i>N</i> -benzoyl-L-tyrosine (Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester)
α -CHCA	Acide α -cyano-hydroxycinnamique
CPG	Particules de verre poreux (Controlled Pore Glass)
CE	Électrophorèse capillaire (Capillary Electrophoresis)
Da	Dalton
DTT	Dithiothréitol
GA	Glutaraldéhyde
HbA	Hémoglobine humaine adulte
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
IAM	Iodoacétamide
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
MALDI	Désorption/ionisation laser assistée par matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MS	Spectrométrie de masse
TAME	Ester de méthyle de <i>N</i> - α <i>p</i> -tosyl-L-arginine (<i>N</i> - α <i>p</i> -Tosyl-L-Arginine Methyl Ester)
TFA	Acide trifluoroacétique
TOF	Temps de vol (Time of flight)
TLCK	<i>N</i> - α -Tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone (<i>N</i> - α -Tosyl-L-Lysine Chloromethyl Ketone)
TPCK	<i>N</i> - <i>p</i> -Tosyl-L-phénylalaninechlorométhyl cétone (<i>N</i> - <i>p</i> -Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone)
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	Ultraviolet
Vis	Visible

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été financé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

Je voudrais remercier ma directrice de recherche, le professeur Karen C. Waldron, pour ses conseils scientifiques et sa disponibilité. J'aimerais aussi remercier le professeur Andreea Schmitzer et les membres de son groupe pour m'avoir laissée utiliser leur spectrophotomètre. Je voudrais aussi remercier les membres du laboratoire de spectrométrie de masse, notamment Alexandra Furtos et Marie-Christine Tang, pour leur aide et leurs conseils scientifiques concernant la prise des données par MALDI-TOF-MS.

Je tiens aussi à remercier les membres du groupe Waldron (Georgiana, Fatima, Navneet, Denis, Obayda et Shao-Ming) pour leur encouragement et support continuels. Merci aussi à Sylvie du laboratoire d'enseignement pour son aide et à Pierre pour avoir effectué les analyses de tailles des particules.

Enfin, je voudrais surtout remercier mes amis, notamment Alex et Marie-Christine, et ma famille pour leur soutien et support moral mais, surtout, à Jonathan, pour sa patience et sa confiance en moi.

CHAPITRE 1

Introduction et théorie

1.1 Protéines

Les protéines ou plutôt les acides aminés qui constituent celles-ci font partie de la grande classe des biomolécules avec les acides nucléiques, les polysaccharides et les lipides. Elles constituent un groupe diversifié ayant des propriétés intéressantes et sont souvent utilisées pour plusieurs applications reliées aux domaines de la biologie et de la chimie. En fait, les protéines, notamment les enzymes, jouent des rôles très importants dans le fonctionnement des organismes vivants via des réactions biochimiques.

Il existe plusieurs classes d'enzymes. Par contre, ce sont les protéases, notamment la trypsine et la chymotrypsine, qui seront étudiées dans ce cas-ci. Les protéases font la protéolyse en hydrolysant les liens peptidiques entre les acides aminés de la chaîne polypeptidique constituant une protéine donnée. La trypsine (EC 3.4.21.4) et la chymotrypsine (EC 3.4.21.1) sont des protéases bien connues notamment pour leur spécificité envers leurs substrats. En fait, la trypsine (EC 3.4.21.4) clive le lien peptidique du côté C-terminal de la lysine (K) et de l'arginine (R) de ses substrats, tandis que la chymotrypsine (EC 3.4.21.1) clive du côté C-terminal des acides aminés aromatiques, tels que la tyrosine (Y), la phénylalanine (F) et la tryptophane (W), mais clive aussi du côté C-terminal de la leucine (L). La trypsine et la chymotrypsine possèdent la même triade catalytique montrée à la figure 1.

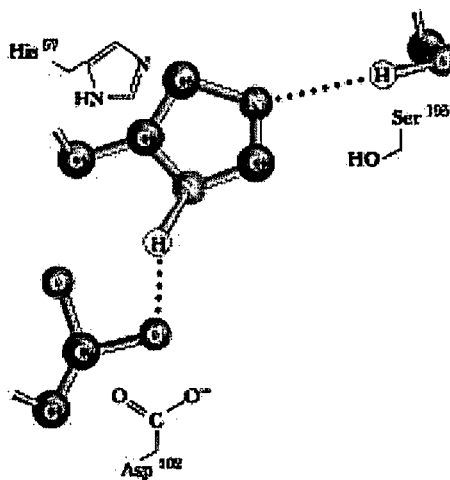


Figure 1. Triade catalytique de la chymotrypsine[1]

Par contre, dans le cas de la chymotrypsine, les groupements aromatiques de F, W et Y se glissent aisément dans sa poche hydrophobique située près de la triade catalytique. Pour ce qui est de la trypsine, elle contient un résidu anionique, l'acide aspartique (D), dans la poche de spécificité qui attire les chaînes latérales cationiques de K et R afin de former des ions paires avec le résidu de D[2]. En fait, en clivant leurs substrats aux endroits spécifiques de la chaîne peptidique de la protéine en question, il est alors possible d'obtenir une carte peptidique de la protéine en utilisant une méthode de séparation adéquate.

1.2 Cartographie peptidique

La cartographie peptidique utilisant une enzyme protéolytique est un outil bioanalytique souvent utilisée pour caractériser les protéines en donnant la possibilité d'identifier les modifications post-translationnelles ou des anomalies quant à la chaîne peptidique. Une variation quelconque de la carte peptidique, telle que le changement de temps de migration d'un seul pic, peut indiquer une modification ou une substitution d'un ou plusieurs acides aminés[3, 4]. Ce changement devient surtout important lors de la détection d'une maladie qui provient d'une modification de la protéine. La cartographie peptidique comporte trois étapes : 1) la dénaturation de la protéine, 2) son clivage par une enzyme et 3) la séparation des peptides obtenus. Les meilleurs exemples pour illustrer son utilité sont les études faites par Ingram lors des années 50 lorsqu'il a démontré que la carte peptidique de l'hémoglobine d'un patient atteint d'une anémie différenciait de l'hémoglobine d'un patient en santé[5, 6]. Par contre, le plus gros désavantage d'une enzyme protéolytique soluble est son autoprotéolyse donnant des pics non voulus et non reproductibles sur la carte peptidique la rendant ainsi difficile à interpréter. Afin d'éviter cela, les enzymes protéolytiques insolubles sont alors utilisées pour éliminer ces pics.

1.2.1 Enzymes insolubles

Les enzymes protéolytiques insolubles sont utiles puisqu'elles ne donnent pas de pics d'autoprotéolyse à cause de l'augmentation de sa stabilité et la diminution de sa mobilité évitant alors sa capacité de s'autodigérer. De même, il y a aussi d'autres avantages à des enzymes insolubles tels que la possibilité d'utiliser une plus grande

quantité d'enzyme, améliorant alors le temps et l'efficacité de la réaction protéolytique, la réutilisabilité de l'enzyme insoluble, puisque sa séparation de son substrat est très facile, et la possibilité de mettre l'enzyme insoluble en format microréacteur.

Durant les années, plusieurs méthodes d'insolubilisation d'enzyme ont été développées. En fait, les méthodes disponibles pour l'immobilisation d'enzyme peut être divisées en deux classes générales : les méthodes chimiques, où il y a des liens covalents qui sont formés avec l'enzyme, et des méthodes physiques où il existe des interactions faibles entre le support et l'enzyme[7]. Ces dernières méthodes physiques incluent aussi l'encapsulation de l'enzyme ou son piégeage. Il suit que l'immobilisation d'une protéine par lien covalent est plus stable que celle par une simple adsorption physique[8].

Les protocoles pour l'immobilisation covalente d'enzymes commence souvent par une modification de la surface par une étape d'activation[7]. Le glutaraldéhyde (fig. 2) est souvent utilisé dans ces cas-ci, qu'il soit utilisé comme agent de réticulation[7, 9, 10] ou pour simplement insolubiliser l'enzyme[11-13], notamment par le fait qu'il soit un dialdéhyde qui a une grande réactivité envers les amines primaires trouvés en abondance dans les protéines. Le mécanisme de sa réticulation avec l'enzyme ainsi que les différentes formes de glutaraldéhyde en solution sont discutables. Quelques mécanismes sont suggérés par Betancor *et al.* pour l'immobilisation de protéines sur des supports activés via le glutaraldéhyde[14]. Migneault *et al.* suggèrent quelques mécanismes, tels que la condensation aldol et l'addition de type Michael, et démontrent quelques réactions possibles pour des différentes formes de glutaraldéhyde[15].

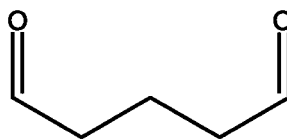


Figure 2. Structure du glutaraldéhyde

L'immobilisation d'enzymes sur des billes de verre ou un support solide quelconque est la méthode la plus connue. Porter *et al.* utilisent des enzymes immobilisées sur des billes de verres poreuses, telles que la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine, pour démontrer la capacité de digestion de certaines protéines extraites de

sources végétales et animales[16]. Bonneil *et al.* démontrent l'efficacité d'un microréacteur fait à partir de la trypsine immobilisée sur des billes de verres poreuses pour la cartographie peptidique[17]. Hu *et al.* immobilisent la pepsine sur des microsphères de poly(méthacrylate de méthyle) de façon à obtenir une activité optimale de 50% de celle de la pepsine libre[18]. Shukla et Devi utilisent le copolymère d'acrylamide et de méthacrylate de 2-hydroxyéthyl comme support pour l'immobilisation de pepsine pour ensuite l'appliquer pour l'hydrolyse de la caséine[19]. Geng *et al.* immobilisent la trypsine sur une couche de phosphate de γ -zirconium[9] pour profiter de cette surface inorganique qui comporte plusieurs avantages tels que des bonnes propriétés mécaniques, la stabilité thermique et la résistance contre des attaques microbiales et contre des solvants organiques[10]. Des telles surfaces sont donc utiles pour des applications liées à la catalyse, les semi-conducteurs, les échangeurs d'ions, les appareils et les récepteurs pour l'emmagasiner d'énergie. En fixant des espèces biologiquement actives à des matériaux inorganiques, on combine alors la grande sélectivité des réactions enzymatiques avec les propriétés mécaniques et chimiques du support[20].

En simplement immobilisant l'enzyme sur un support solide la rendant insoluble, l'enzyme peut alors être simplement enlevée par filtration ou centrifugation n'importe quand durant la réaction de digestion. Habeeb insolubilise la trypsine par le glutaraldéhyde en réticulant cette dernière dans un réseau intermoléculaire où l'ajout du sulfate d'ammonium solide était parfois nécessaire pour obtenir un précipité[11]. Jansen *et al.*, quant à eux, démontrent leurs méthodes de la réticulation de la α -chymotrypsine ainsi que quelques autres enzymes où la température du milieu de réaction a été baissée jusqu'à 0°C était pour avoir l'insolubilisation de la chymotrypsine[12]. De plus, Rajput et Gupta utilisent le glutaraldéhyde pour créer un coagrégat de trypsine et de chymotrypsine. En fait, la coagrégation de deux enzymes est intéressante puisqu'un tel agrégat combine les avantages d'une agrégation chimique avec la coimmobilisation[13]. Le plus gros avantage de l'agrégation chimique sur la liaison des enzymes sur un support insoluble est que le support solide ajoute un volume important au réacteur qui est réduit énormément lors de l'agrégation[21]. Migneault *et al.* font la comparaison entre deux techniques d'immobilisation avec le glutaraldéhyde, soient une avec des billes de verres poreuses activées comme support solide pour le couplage covalent à la trypsine et une

sans support solide où la trypsine est directement réticulée avec le glutaraldéhyde, préparées à la température de la pièce et qui semblent être efficaces[22].

En fait, le support ainsi que l'agent de réticulation utilisés déterminent l'activité spécifique des enzymes immobilisées. Le support solide ne devrait pas bloquer le site actif de l'enzyme l'empêchant alors de se lier à son substrat et ensuite diminuer l'activité catalytique de l'enzyme. Lors de l'utilisation d'un agent de réticulation tel que le glutaraldéhyde, le choix des ratios d'enzyme-glutaraldéhyde ainsi que leurs concentrations finales sont critiques puisque l'insolubilisation de l'enzyme doit seulement causer une distortion minimale de sa structure afin de garder son activité catalytique[15].

1.2.2 Les microréacteurs

Les microréacteurs peuvent être utilisés pour différentes applications, telles que l'amélioration de la détection des produits par la production de produits plus absorbants ou par préconcentration[23, 24], la détermination des substrats et des inhibiteurs[25-27] et la cartographie peptidique[28-37]. Dans cet ordre d'idée, des microréacteurs à base d'enzymes immobilisées couplés à l'électrophorèse capillaire ont été fabriqués pour, notamment, répondre aux besoins de miniaturisation et d'automatisation.

En fait, plusieurs modèles de microréacteurs pour la cartographie peptidique couplés à l'électrophorèse capillaire ont été développés dans les dernières années. En général, les modèles en ligne possèdent les éléments tels que figurés dans le schéma suivant.

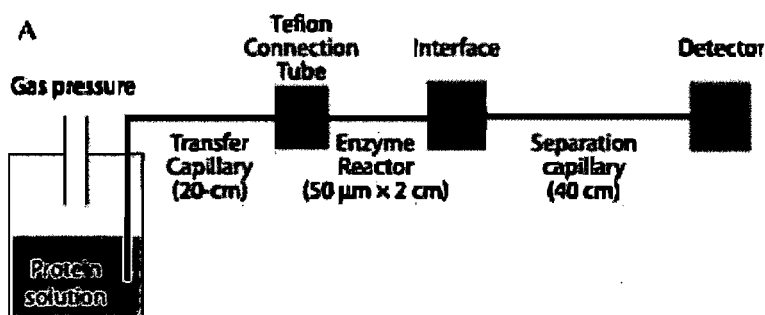


Figure 3. Schéma illustrant les digestions protéiques en ligne[36]

Un certain volume d'un échantillon de protéine est alors injecté à l'aide d'une pression gazeuse (par azote ou argon) dans un capillaire de transfert ce qui l'amène ensuite vers le

microréacteur contenant de l'enzyme immobilisée. C'est alors dans ce microréacteur que s'effectue la digestion enzymatique. Les peptides sont ensuite dirigés vers le capillaire de séparation du système d'électrophorèse capillaire où s'effectue la séparation.

Bonneil[17] a développé un microréacteur fait à partir de la trypsine immobilisée sur des billes de verres poreuses (CPG) montré à la figure 4.

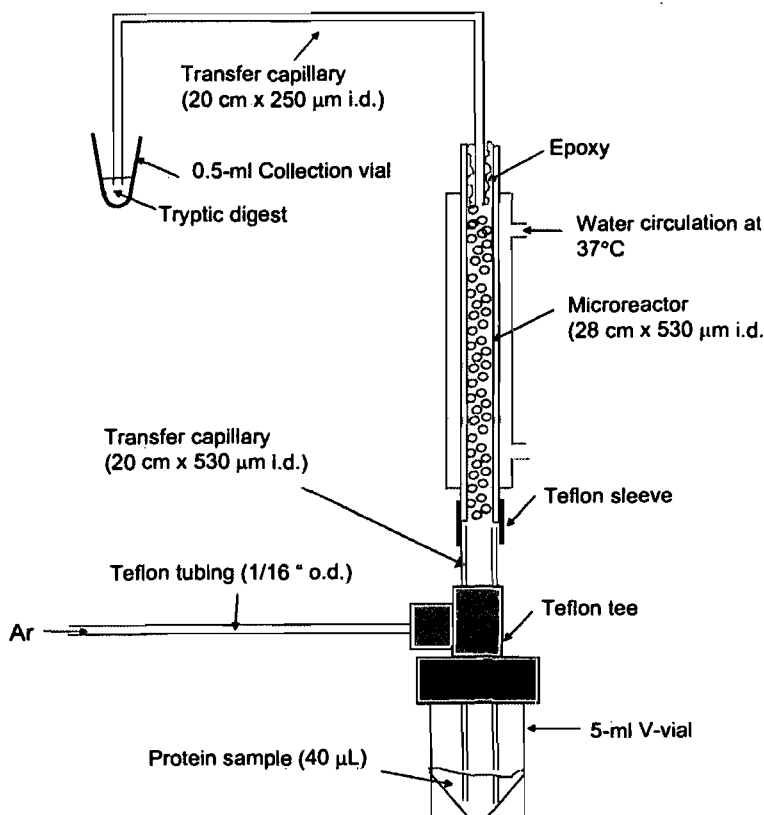


Figure 4. Diagramme du montage de la digestion dans le microréacteur de trypsine immobilisée sur des billes de verres poreuses (CPG)[17]

Ce microréacteur sera le point de départ des études faites pour les microréacteurs (chap. 6).

1.2.3 La cinétique des enzymes

Les études cinétiques sont très importantes lors de la caractérisation des enzymes. Elles peuvent fournir plusieurs informations telles que l'affinité des substrats et des inhibiteurs envers une enzyme, le taux catalytique maximal d'une enzyme et les mécanismes

catalytiques peuvent être déduits. Les informations recueillies lors des études cinétiques servent surtout à la compréhension du rôle de l'enzyme lors des processus biologiques.

L'activité cinétique est étudiée lors de la formation de complexes enzyme-substrat. Pour une enzyme à un simple substrat, sa réaction est la suivante :



où E est l'enzyme, S est le substrat, E · S est le complexe enzyme-substrat et P est le produit de la réaction. La concentration du complexe E · S formé détermine le taux de la réaction puisqu'il est le réactant lors de la conversion du substrat. Donc, le taux de la réaction atteint un maximum lorsque toute l'enzyme disponible forme le complexe E · S. On obtient facilement cette situation à des concentrations élevées de substrat où l'enzyme est alors saturée avec le substrat.

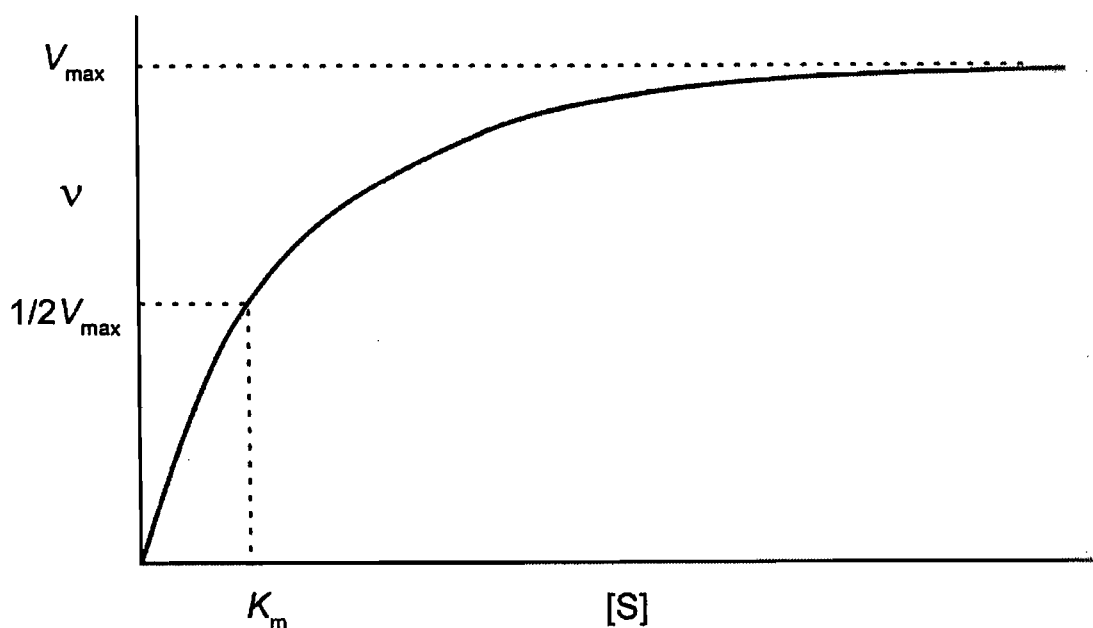


Figure 5. Courbe de Michaelis-Menten[38]

En mesurant la vitesse initiale, donc un changement de signal en fonction du temps, à différentes concentrations de substrats, il est alors possible de tracer la courbe de Michaelis-Menten (Figure 5) en portant les vitesses initiales obtenues en fonction de leurs concentrations de substrat correspondantes. L'équation suivante décrit la relation observée sur la courbe de Michaelis-Menten :

$$v = (V_{\max} [S]) / (K_M + [S]) \quad (2)$$

où v est la vitesse de la conversion du substrat en produit à une concentration de substrat donnée, V_{\max} est la vitesse maximale de la réaction enzymatique (atteinte lorsque toute la quantité d'enzyme aurait complexé avec le substrat) et K_M est la constante de Michaelis-Menten. En fait, K_M est définie comme la concentration de substrat à laquelle la vitesse réactionnelle maximale (V_{\max}) est à sa moitié. Cette dernière est atteinte lorsqu'il y a saturation de l'enzyme par le substrat. Donc, si l'enzyme possède une petite valeur de K_M , cela veut dire qu'elle atteint son activité catalytique maximale à des basses concentrations de substrats. L'amplitude de K_M varie énormément sur l'identité de l'enzyme ainsi que la nature du substrat. Elle est aussi en fonction de la température et du pH[2].

La concentration d'une solution d'enzyme est souvent donnée en unité internationale d'activité (U. I.), qui représente la conversion d'un micromole de substrat par minute, par unité masse (mg) d'enzyme. L'activité spécifique d'une enzyme est définie comme une unité internationale d'activité par unité de masse d'enzyme à une température et à un pH donnés. Elle est souvent utilisée pour déterminer la pureté d'une enzyme, *i.e.* plus l'activité spécifique d'une enzyme est élevée, plus elle est pure. Pour la trypsine, le TAME (ester de méthyle de N - α p -Tosyl-L-arginine), un substrat artificiel de la trypsine, est souvent utilisé pour mesurer son activité spécifique puisqu'il est facile de mesurer son changement d'absorbance ultraviolette lors de son hydrolyse en TA (N - α p -Tosyl-L-arginine) par l'enzyme.



Une molécule de méthanol (MeOH) est alors libérée lors de la réaction enzymatique précédente. Puisque le TA absorbe à 247 nm, la réaction d'hydrolyse peut être suivie par spectrophotométrie UV et l'activité spécifique de la trypsine est alors calculée par l'équation suivante :

$$\text{Activité spécifique de la trypsine} = \frac{\Delta A_{247} / t \times 1000 \times V}{540 \times m} \quad (5)$$

où ΔA_{247} est la variation d'absorbance de la solution à 247 nm, t est l'intervalle de temps sur lequel l'absorbance a été mesurée (min), 1000 est un facteur de conversion pour les unités utilisés, V est le volume de la réaction (mL), m est la masse d'enzyme (mg) et 540

$M^{-1}\cdot cm^{-1}$ est le coefficient d'absorptivité molaire de TA à 247 nm. La chymotrypsine, à son tour, hydrolyse son substrat, le BTEE (ester d'éthyle de *N*-Benzoyl-L-tyrosine), un substrat artificiel de la chymotrypsine, de façon à donner du BT (*N*-Benzoyl-L-tyrosine) et une molécule d'éthanol (EtOH).



Son activité spécifique est donc définie par l'équation suivante :

$$\text{Activité spécifique de la chymotrypsine} = \frac{\Delta A_{256}/t \times 1000 \times V}{964 \times m} \quad (7)$$

où ΔA_{256} est la variation d'absorbance à 256 nm et $964 M^{-1}\cdot cm^{-1}$ est le coefficient d'absorptivité molaire de BT à 256 nm.

1.2.4 Techniques d'analyses des fragments peptidiques

La cartographie peptidique se fait essentiellement soit par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)[39-42] ou par électrophorèse capillaire (CE)[22, 32, 33, 35, 42-44]. Par contre, le CE est parfois plus attirant puisque cette technique de séparation offre une simplicité, une rapidité et une grande efficacité de séparation en requérant moins d'échantillon et de solvant que la HPLC[17]. Le petit diamètre interne du capillaire utilisé pour le CE permet une très petite diffusion comparée à celle obtenue par HPLC, donc il est possible d'obtenir des pics beaucoup plus étroits. Par contre, un plus petit diamètre interne du capillaire pour le CE donne aussi un plus petit parcours du chemin optique lors de la détection par UV-vis comparativement au HPLC. Le CE possède alors une meilleure limite de détection que le HPLC en concentration. En fait, la spectrométrie de masse (MS) aussi est souvent utilisée pour l'identification des protéines[45-48] grâce à sa bonne résolution et à sa détection sensible envers des peptides. Donc, le couplage d'une technique de séparation à l'électronébulisation (ESI)-MS permet alors l'identification de la protéine de qui proviennent les fragments peptidiques lorsque la détection MS en tandem est employée. Le MALDI (désorption/ionisation laser assistée par matrice)-MS, qui n'est généralement pas couplé à l'HPLC, est aussi utilisé pour l'analyse des peptides grâce à la cartographie massique[48]. Étant les techniques employées dans ce travail, seuls le CE et le MALDI-MS seront décrits dans les sections suivantes.

1.2.4.1 Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique de séparation qui permet la migration de particules chargées dans un milieu lors de l'application d'un champ électrique (fig. 4).

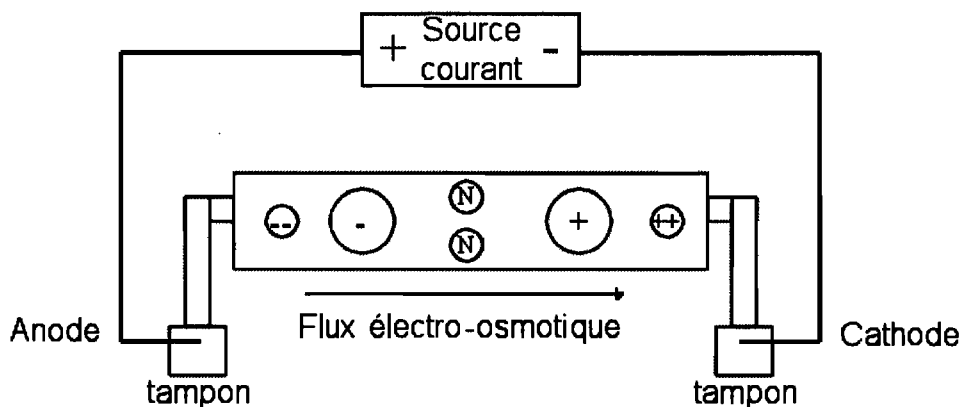


Figure 6. Diagramme de l'électrophorèse capillaire[49]

Il y a deux phénomènes en électrophorèse qui définissent le mouvement des analytes dans le capillaire : l'électro-osmose et l'électrophorèse. L'électro-osmose est produit à cause de la formation d'une double couche électrique formée sur la paroi du capillaire due au contact de la silice fondue avec le tampon. Ce dernier est indépendant des analytes injectés. L'électrophorèse, quant à elle, est produite à cause du mouvement des analytes chargés lors de l'application du voltage. Ce dernier est dépendant des analytes et du milieu. Le mouvement des analytes à travers le capillaire vient de la somme des deux derniers phénomènes. Donc, en modifiant la solution tampon utilisée (son pH ou sa composition) ou même le voltage appliqué, il est alors possible de modifier la séparation des analytes.

Lors de ces études, cette dernière technique de séparation est significativement utilisée pour la séparation des peptides. Les acides aminés constituant un peptide sont tous constitués d'un groupement amine, d'un groupement acide carboxylique et une chaîne latérale (R).

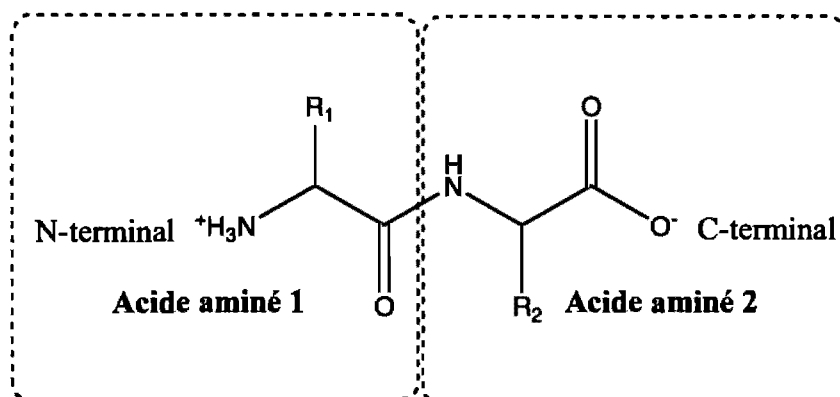


Figure 7. Structure d'un dipeptide

Un peptide formé de deux ou plusieurs acides aminés possède, donc, un côté N-terminal et un côté C-terminal. Sachant que le groupement amine possède généralement un $pK_a \sim 9-11$ et que le groupement carboxylique possède un $pK_a \sim 2$, il est préférable de choisir un pH pour la séparation qui permettrait de minimiser l'interaction des peptides avec le paroi du capillaire et qui permettrait de bonnes séparations par électrophorèse capillaire. Le pH choisi pour faire les analyses est de 2.5[50].

1.2.4.2 Spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS)

Le MALDI (« *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* ») est une technique d'ionisation dite « douce », donc qui génère peu de fragmentations des ions analytes en phase gazeuse. Afin de générer une phase gazeuse constituée de molécules protonées, un grand excès de matrice est co-cristallisé avec des molécules d'analytes lorsqu'un volume d'un microlitre de ce dernier mélange est déposé sur une surface métallique le permettant alors de sécher. La matrice solide est ensuite irradiée par de courtes impulsions laser provenant habituellement par de petits laser d'azote avec une longueur d'onde de 337 nm. La matrice utilisée absorbe la radiation émise et il y a alors dissociation de celle-ci et sublimation du mélange analyte-matrice (fig. 6).

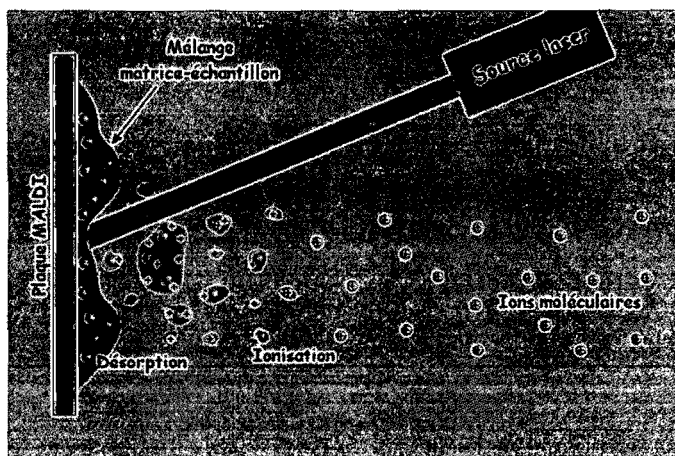


Figure 8. Désorption laser avec matrice (MALDI)[51]

En fait, la matrice utilisée est importante puisqu'elle absorbe la radiation, donc l'énergie, émise par le laser ce qui occasionne ensuite la dissociation de la matrice. Cette dissociation rapide de la matrice libère des molécules neutres et d'analytes en phase gazeuse et produit une zone de plus haute pression près de la surface irradiée. Cette haute pression génère une expansion supersonique amenant avec elle les analytes désorbés. Il y a alors transfert de proton à l'ion d'intérêt suite aux collisions générées. Les matrices diffèrent dans la quantité d'énergie qu'elles transfèrent aux biomolécules durant la désorption-ionisation, selon sa capacité d'absorber la lumière émise à la longueur d'onde utilisée, et donc le degré de fragmentation qu'elles imposent. Les matrices qui sont généralement utilisées pour des travaux avec les biomolécules sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -CHCA) et l'acide dihydrobenzoïque (DHB). Par contre, la matrice de α -CHCA est préférée puisqu'elle apporte généralement la plus grande sensibilité en MALDI[48].

L'analyseur de choix pour le MALDI est le TOF (temps d'envol) puisque le MALDI génère des impulsions courtes d'ions dans le vide. Les ions obtenus par l'impulsion laser sont accélérés avec une énergie cinétique fixe et se dirigent vers le tube d'envol. Les petits ions ont une plus grande vitesse et arrivent au détecteur avant les plus gros ions.

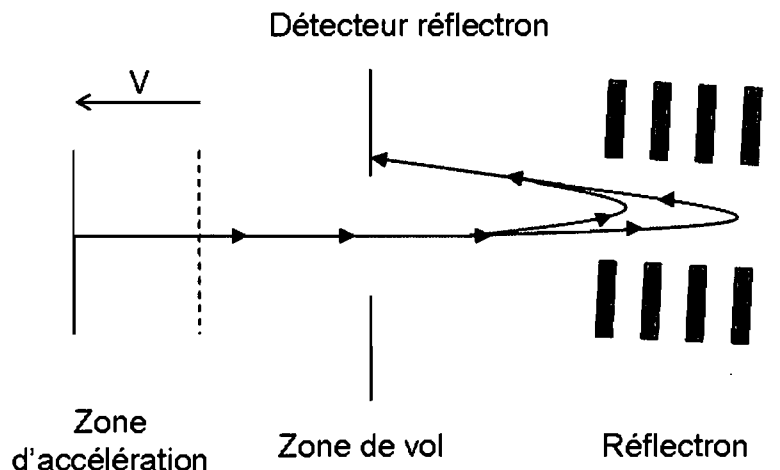


Figure 9. Analyseur temps d'envol[52]

1.2 Buts des études effectuées et approches expérimentales

Les travaux précédents du groupe faits par Migneault *et al.* montrent l'efficacité de la trypsine réticulée par le glutaraldéhyde pour son utilisation pour la cartographie peptidique par CE muni d'un détecteur UV[15, 22, 42, 50]. Bonneil a montré l'efficacité de son microréacteur, qui était couplé au système d'électrophorèse capillaire, rempli de billes de verre (CPG)-trypsine pour la cartographie peptidique[17, 30, 31].

Ce présent travail de recherche vise, tout d'abord, à développer une méthode de réticulation similaire à celle pour la trypsine, faite par Migneault[50], pour la chymotrypsine (Chap. 3) et aussi trouver un moyen pour améliorer l'activité de la trypsine réticulée (Chap. 4). L'activité enzymatique était aussi évaluée par essai spectroscopique comme décrit dans la section 1.2.2 et les cartes peptidiques des substrats étalons ont été faits par détection CE-UV. Ensuite, des études sur les méthodes de quantification du glutaraldéhyde seront faites (Chap. 5). Finalement, le développement d'un microréacteur à base d'enzyme réticulée par le glutaraldéhyde couplé au système d'électrophorèse capillaire sera fait pour la cartographie peptidique (Chap. 6). Quelques résultats par MALDI-MS sont aussi présentés.

CHAPITRE 2

Partie expérimentale

2.1 Produits chimiques

L'hémoglobine humaine (HbA), l'anhydrase carbonique (CA), la trypsine bovine (traitée avec l'inhibiteur TPCK; activité $\geq 10\,000$ BAEE U/mg de protéine), l' α -chymotrypsine bovine (traitée avec l'inhibiteur TLCK; activité ≥ 40 U/mg de protéine), l'ester de méthyle de *N*- α *p*-Tosyl-L-arginine (TAME), l'ester d'éthyle de *N*-Benzoyl-L-tyrosine (BTEE), le phosphate de sodium monobasique monohydraté, le phosphate de sodium dibasique heptahydraté, le bicarbonate d'ammonium, l'acide borique, le chlorure de sodium, la glycine, l'urée, l'hydroxyde de sodium, l'iodoacétamide (IAM), le dithiothréitol (DTT), le benzamidine, le 3-aminopropyltriéthoxysilane 99% (3-APTS) et le glutaraldéhyde 25% grade II (GA) proviennent de chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) a été acheté chez Fluka (Oakville, ON, Canada). L'acide formique provient de chez Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada) et l'acide α -cyano-hydroxycinnamique (α -CHCA), purifié par recristallisation dans l'éthanol, provient de chez Sigma (St-Quentin-Fallavier, France). L'acide chlorhydrique provient de chez Anachemia (Montréal, QC, Canada).

L'eau utilisée pour préparer toutes les solutions a été distillée et purifiée par filtration et déionisation avec un système multi-cartouche commercialisé par Millipore (Milford, MA, USA). La solution tampon utilisée pour l'électrophorèse capillaire a été filtrée avec des filtres en nylon de 0.2 μm (Chromatographic Specialties, Brockville, ON, Canada). Le capillaire de séparation (non modifié, silice fondue, 50 μm d.i., 360 μm d.e.), les capillaires utilisés pour les microréacteurs hors ligne (non modifié, silice fondue, 530 μm d.i., 800 μm d.e.) avec des capillaires de transfert (non modifié, silice fondue, 250 μm d.i., 400 μm d.e.) et les capillaires utilisés pour les microréacteurs en ligne (non modifié, silice fondue, 250 μm d.i., 400 μm d.e.) proviennent de chez Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Les tubes de microcentrifugation utilisés (0.6, 1.5 et 2.0 mL) et les tubes de PCR 0.2 mL proviennent de chez Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada).

2.2 Instrumentation

2.2.1 Spectrophotométrie d'absorption UV

Les rendements des réactions de réticulation de la trypsine ainsi que de la chymotrypsine et leur activité spécifique ont été déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 100 Bio UV-Visible de chez Varian (St-Laurent, QC, Canada) contrôlé par le logiciel Cary WinUV®. Les quantités de trypsine et de chymotrypsine restantes dans les surnageants ainsi que toutes les solutions de lavage ont été déterminées en utilisant la même méthode que Migneault[50]. Les mesures ont été prises entre 300 et 280 nm à une vitesse de balayage de 10 nm/min (temps d'intégration : 0.6 s; intervalle de données : 0.1 nm). Les spectres de 4^e dérivée ont été calculés à l'aide de l'algorithme de Savitsky-Golay inclus dans le logiciel (filtre : 15 points; intervalle de données : 0.3 nm). Toutes les mesures ont été faites en triplicata.

L'activité catalytique de la trypsine (libre et réticulée) et de la chymotrypsine (libre et réticulée) ont été calculées en mesurant les vitesses d'hydrolyse initiales de leur substrat correspondant (le TAME et le BTEE respectivement) à des concentrations différentes en gardant la quantité d'enzyme constante[53]. L'absorbance du TA (*N*- α *p*-Tosyl-L-arginine), le produit d'hydrolyse du TAME, a été mesurée à 247 nm jusqu'à l'obtention d'un plateau à 25°C dans une solution tamponnée à pH 8.0. Son activité spécifique a été calculée avec l'équation 4 du Chap. 1. L'absorbance du BT (*N*-Benzoyl-L-tyrosine), le produit d'hydrolyse du BTEE, a été mesurée à 256 nm jusqu'à l'obtention d'un plateau à 25°C dans des solutions tamponnées à plusieurs pH situés entre 6.9 et 8.5 pour déterminer le pH optimal d'hydrolyse. Les activités spécifiques à différents pH ont été calculées avec l'équation 7 du Chap. 1 et ont été rapportées comme des pourcentages de l'activité maximale mesurée. Les paramètres cinétiques ont été déterminés à partir des courbes de Michaelis-Menten tracés par le logiciel Origin 6.0® (voir Figure 5 du Chap. 1).

2.2.2 Électrophorèse capillaire

Le système d'électrophorèse capillaire utilisé pour obtenir la séparation des peptides et pour les réactions de réticulation dans les microréacteurs en ligne est le

système P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) relié au logiciel 32 Karat (version 5.0) et muni d'un détecteur UV ou LIF.

Pour les séparations, les capillaires utilisés possédaient une longueur totale de 60 cm et une longueur effective de 50 cm au détecteur (d.i. = 50 µm). Les échantillons ont été injectés en appliquant une pression hydrodynamique de 0.5 psi pendant 5.0 secondes (volume injecté de 5 nL) et les séparations ont été faites en appliquant un voltage de 15 kV. Les solutions utilisées (la solution tampon de séparation et les solutions pour les lavages) ont été préalablement filtrées par des filtres à seringues en Nylon de 0.2 µm.

Pour les séparations des peptides et des acides aminés aromatiques avec détection par absorption UV à 200 nm, la solution tampon de séparation utilisée en UV a été préparée avec du phosphate de sodium monobasique 50 mM et ajusté au pH 2.5 à l'aide de l'acide phosphorique. Le capillaire a été rincé avec du NaOH 1 M, de l'eau, du HCl 1 M, du HCl 0.1 M et ensuite avec la solution tampon de séparation avant chaque analyse (tel qu'indiqué en Annexe C).

2.2.3 Spectrométrie de masse

Les échantillons ont préalablement été purifiés et préconcentrés en utilisant des Zip Tips_{C18}® de marque OMIX. L'acide α-cyano-hydroxycinnamique (α-CHCA), la matrice, a été dilué à 10 mg/mL dans une solution d'acétonitrile 50% contenant du TFA 0.1%. Les dépôts sur la plaque MALDI ont été faits par la méthode de goutte séchée (1 µL d'échantillon et 1 µL de la solution de matrice). Les spectres MALDI ont été obtenus à l'aide de l'appareil de marque Waters MALDI Micro MX équipé d'un laser N₂ à 337 nm, en mode positif, entre m/z 700 et 7000. Le voltage d'accélération était de 15 kV. Le mode réflectron a été utilisé en combinaison avec l'extraction retardée (725 ns). Les spectres ont été traités avec le logiciel MassLynx version 4.0.

2.2.4 Analyse de taille des particules par diffraction laser

La détermination et la distribution de la taille des particules de trypsine et de chymotrypsine réticulées ont été mesurées par un système d'analyse de tailles de particules par diffraction laser à l'aide du système HORIBA *Partica* LA-950. Les enzymes réticulées de concentrations initiales d'environ 0.13 mM dans l'eau déionisée

ont été utilisées pour les mesures. Une vitesse de circulation de 10 ou de 15 mL/min a été utilisée avec une gamme de taille entre 0.010 et 3000 μm .

2.3 Procédures

2.3.1 *Trypsine libre*

2.3.1.1 *Études cinétiques*

Les solutions ont été préparées dans la solution tampon de Tris-HCl 50 mM contenant du CaCl_2 10 mM pH 8.0 dans des cuvettes en quartz. La cuvette utilisée comme blanc contenait 2.800 mL de TAME et 0.200 mL de solution tampon. La cuvette utilisée comme test contenait 2.800 mL de solution de TAME et 0.200 mL de trypsine pour donner une concentration finale de 0.0332 μM . Les solutions de TAME utilisées possédaient des concentrations finales entre 0.1 et 0.7 mM. L'augmentation de l'absorbance à 247 nm en fonction du temps (intervalle de données : 0.05 s) a été mesurée à l'aide de la fonction Kinetics du logiciel Cary WinUV®.

2.3.1.2 *Digestion de HbA*

La même méthode de dénaturation de protéine que Migneault a été utilisée[22]. Huit mg de HbA a d'abord été dissout dans 0.800 mL de solution tampon NH_4HCO_3 400 mM pH 8 contenant de l'urée 8 M. La protéine a alors été réduite lors de l'ajout de 0.120 mL de DTT 45 mM (15 min, 50°C) et ensuite alkylée lors de l'ajout de 0.120 mL de IAM 100 mM à l'obscurité (15 min, 22°C).

Préalable à la digestion, la protéine dénaturée a été diluée à 2 mg/mL dans une solution tampon de NH_4HCO_3 50 mM pH 8. Une solution de trypsine libre a été ajoutée pour obtenir un rapport massique final de 1:25 enzyme:protéine et le mélange réactionnel a été incubé pendant 4 h à 37°C. Les peptides ont ensuite été conservés à -20°C après la réaction de digestion jusqu'à son analyse par CZE ou analysés immédiatement.

2.3.2 *Trypsine réticulée avec le glutaraldéhyde*

2.3.2.1 *Réticulation de la trypsine avec le glutaraldéhyde*

Selon la procédure de réticulation de Migneault[22], 0.200 mL de la trypsine 1.3 mM aq. a été ajoutée à 1.640 mL d'une solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 6.8 dans

un tube de centrifugation de 2.0 mL. Ensuite, 0.235 mL d'une solution de GA 2.5% a été ajoutée goutte par goutte dans le milieu réactionnel et le mélange a été laissé à 22°C pendant 2 h. Il a ensuite été centrifugé à $327 \times g$ (3000 rpm) pendant 2 min afin de séparer la trypsine réticulée des peptides tryptiques et 1.000 mL du surnageant, contenant les peptides, a été prélevé. Les solides ont ensuite été lavés avec 3×1 mL de solution tampon, 3×1 mL de NaCl 500 mM et 3×1 mL de solution tampon. Un volume de 1.000 mL de glycine 200 mM a ensuite été ajouté au mélange réactionnel et laissé à 22°C pendant 3 h. Le mélange final a été centrifugé à $327 \times g$ (3000 rpm) pendant 2 min, le surnageant a été prélevé et les solides ont alors été lavés avec 3×1 mL de solution tampon et 3×1 mL d'eau déionisée. La trypsine réticulée a été gardée dans l'eau déionisée à 4°C jusqu'à usage.

2.3.2.2 Détermination du rendement de réticulation

Les solutions de lavage et le surnageant récupéré avant l'ajout de la glycine ont été utilisées pour déterminer le rendement de la réaction de réticulation. La quantité de trypsine restante a été évaluée en effectuant une courbe d'étalonnage de solutions de trypsine libre de concentrations entre 0.1 et 0.5 mg/mL en utilisant la spectrophotométrie différentielle de 4^e dérivée et en mesurant la différence d'absorbance du mélange réactionnel avant et après réticulation (voir section 2.2.1), et ce, dans les différentes solutions utilisées.

2.3.2.3 Études cinétiques

Les solutions ont été préparées dans la solution tampon Tris-HCl 50 mM contenant du CaCl₂ 10 mM pH 8.0 dans une cuvette en quartz pour le blanc et dans un tube d'Eppendorf de 2.0 mL avant son transfert dans une cuvette pour la solution test. Le blanc contenait 1.867 mL de TAME et 0.133 mL de solution tampon. Le test contenait 1.867 mL de solution de TAME et 0.133 mL de trypsine pour donner une concentration finale de 1.55 μM ¹. Les surnageants ont été prélevés et analysés à chaque deux minutes dans les cuvettes de quartz jusqu'à 20 minutes de réaction. Le mélange

¹ Le volume et la concentration de la trypsine réticulée ont été mesurés en considérant l'enzyme réticulée comme un soluté en suspension dans son milieu aqueux. Le volume indiqué est pipeté en agitant la suspension et en prélevant rapidement le volume voulu.

réactionnel a été agité entre les mesures pour assurer la suspension de l'enzyme en solution. Les solutions de TAME utilisées possédaient des concentrations finales entre 0.1 et 0.9 mM. L'augmentation de l'absorbance à 247 nm a été mesurée à l'aide de la fonction Simple Reads du logiciel Cary WinUV®.

2.3.2.4 Digestion de HbA

Les mêmes procédures de dénaturation et de digestion ont été utilisées que dans la partie 2.3.1.2 où la trypsine réticulée est ajoutée. Le mélange réactionnel a ensuite été centrifugé à $327 \times g$ (3000 rpm) pendant 2 min et les surnageants contenant les peptides ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à son analyse par CZE ou analysés immédiatement.

2.3.3 Trypsine modifiée avec l'inhibiteur benzamidine et réticulée avec le glutaraldéhyde

2.3.3.1 Inhibition de la trypsine et réticulation de la trypsine inhibée avec le glutaraldéhyde

Des procédures d'inhibition et de réticulation similaires à celle de Beaven et Gratzer[54] ont été développées.

A) Lors des études préliminaires, la procédure suivante a été utilisée : 0.200 mL d'une solution de trypsine 3.32 mg/mL a été ajoutée à 1.599 mL d'une solution tampon de phosphate ou de carbonate ayant des pH variant de 6.8 à 10.7. Ensuite, 0.251 mL d'une solution de benzamidine 0.0998 mM a été ajoutée au mélange. Finalement, 0.025 mL de glutaraldéhyde 2.5% a été ajouté au mélange et le mélange a été laissé réagir pendant 2 h à 22°C .

B) Lors des études faites par Santiagos[55], la procédure suivante a été utilisée : 0.200 mL d'une solution de trypsine ~ 30 mg/mL et 0.251 mL d'une solution de benzamidine 998 mM ont été ajoutées dans une solution tampon de phosphate 50 mM pH 8.5 et de carbonate 0.5% pH 10.5. Le mélange a été réagi pendant 30 min à 22°C . Ensuite, 0.025 mL de glutaraldéhyde 2.5% a été ajouté et le mélange a été réagi pendant 2 h à 22°C . Le mélange a été centrifugé à $327 \times g$ (3000 rpm) pendant 2 min et le surnageant a été prélevé pour analyse. Le mélange a été lavé avec 3×1 mL de solution tampon, 3×1 mL

d'eau et 3×1 mL de solution tampon. Un volume de 1.000 mL de glycine 200 mM a été ajouté au mélange et le mélange a été réagi pendant la nuit à 22°C. Le mélange a finalement été centrifugé et le surnageant a été enlevé. Le mélange a été lavé avec 3×1 mL de solution tampon et 2×1 mL d'eau.

2.3.3.2 Digestion de HbA

Les mêmes procédures de dénaturation et de digestion ont été utilisées que dans la partie 2.3.1.2 où la trypsine modifiée a été ajoutée. Le mélange réactionnel a ensuite été centrifugé à $327 \times g$ (3000 rpm) pendant 2 min et les surnageants contenant les peptides ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à leurs analyses par CZE.

2.3.4 Chymotrypsine libre

2.3.4.1 Études cinétiques

Les solutions ont été préparées dans une solution tampon de Tris-HCl 80 mM contenant du CaCl_2 100 mM pH 7.8 dans des cuvettes de quartz. Le blanc contenait 0.933 mL de solution de BTEE et 1.067 mL de solution tampon. La solution test contenait 0.933 mL de solution de BTEE, 1.000 mL de solution tampon et 0.067 mL de solution de chymotrypsine pour donner une concentration finale d'enzyme de 0.0169 μM . Les solutions de BTEE utilisées possédaient des concentrations finales entre 0.1 et 1.0 mM. L'augmentation de l'absorbance à 256 nm a été mesurée à l'aide de la fonction Kinetics du logiciel Cary WinUV®.

2.3.4.2 Digestion de HbA

Les mêmes procédures de dénaturation et de digestion ont été utilisées que dans la partie 2.3.1.2 où la solution tampon de Tris-HCl 100 mM avec du CaCl_2 10 mM pH 7.8 a été utilisée et la chymotrypsine libre a été ajoutée. Les peptides ont ensuite été conservés à -20°C après la réaction de digestion jusqu'à son analyse par CZE.

2.3.5 Chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde

2.3.5.1 Réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde

Une procédure de réticulation similaire à celle de Migneault *et al.*[22] a été développée. Une étude sur les conditions d'immobilisation, notamment le pH de réticulation, le rapport glutaraldéhyde:chymotrypsine et le pH d'hydrolyse de la chymotrypsine, ont permis le développement de la méthode optimale pour la réticulation de la chymotrypsine. Pour ce faire, 0.200 mL de la chymotrypsine 1.3 mM a été ajouté à une solution tampon de pH varié entre 2.2 et 8.8. Un volume de glutaraldéhyde 2.5% aq. a été ajouté goutte à goutte à la solution de chymotrypsine afin d'avoir des rapports de 1:25 à 1:500 chymotrypsine:glutaraldéhyde (mol:mol) sous agitation douce. Le mélange a été laissé pendant 2 h à 22°C. La solution a été centrifugée à $327 \times g$ (3000 rpm) pendant 2 min et 1.000 mL du surnageant a été conservé afin d'analyser la quantité de chymotrypsine restante par spectrophotométrie UV. Les solides ont ensuite été lavés avec 3×1 mL de solution tampon, 3×1 mL de NaCl 500 mM et 3×1 mL de solution tampon. Un volume de 1.000 mL de glycine 200 mM a ensuite été ajouté au mélange réactionnel et laissé à 22°C pendant 3 h. Le mélange final a été centrifugé à $327 \times g$ (3000 rpm) pendant 2 min, le surnageant a été prélevé et les solides ont alors été lavés avec 3×1 mL de solution tampon et 3×1 mL d'eau déionisée. La chymotrypsine réticulée a été gardée dans l'eau déionisée à 4°C jusqu'à usage.

2.3.5.2 Détermination du rendement de réticulation

Les solutions de lavage et le surnageant récupéré avant l'ajout de la glycine ont été utilisées pour déterminer le rendement de la réaction de réticulation. La quantité de chymotrypsine restante a été évaluée en effectuant une courbe d'étalonnage de solutions de chymotrypsine libre de concentrations entre 0.1 et 0.5 mg/mL en utilisant la spectrophotométrie différentielle de 4^e dérivée et en mesurant les différences d'absorbance du mélange réactionnel avant et après réticulation (voir section 2.2.1).

2.3.5.3 Études cinétiques

Les solutions ont été préparées dans une solution tampon de Tris-HCl 80 mM contenant du CaCl₂ 100 mM pH 7.8 dans une cuvette en quartz pour le blanc et dans un

tube d'Eppendorf de 2.0 mL avant son transfert dans une cuvette pour la solution test. Le blanc contenait 0.933 mL de solution BTEE et 1.067 mL de solution tampon. Le test contenait 0.933 mL de solution BTEE, 1.000 mL de solution tampon et 0.067 mL de chymotrypsine réticulée pour donner une concentration finale de $1.7 \mu\text{M}^2$. Les surnageants ont été prélevés et analysés à chaque deux minutes dans les cuvettes de quartz jusqu'à 10 minutes de réaction. Le mélange réactionnel a été agité entre les mesures pour assurer la suspension de l'enzyme en solution. Les solutions de BTEE utilisées possédaient des concentrations finales entre 0.5 et 2.5 mM. L'augmentation de l'absorbance à 256 nm a été mesurée à l'aide de la fonction Simple Reads du logiciel Cary WinUV®.

2.3.5.4 Digestion de HbA

Les mêmes procédures de dénaturation et de digestion ont été utilisées que dans la partie 2.3.1.2 où une solution tampon de Tris-HCl 100 mM avec du CaCl_2 10 mM pH 7.8 a été utilisée et la chymotrypsine réticulée a été ajoutée. Le mélange réactionnel a ensuite été centrifugé à $327 \times g$ (3000 rpm) pendant 2 min et les surnageants contenant les peptides ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à son analyse par CZE.

2.3.6 Chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde dans le microréacteur hors ligne

Le microréacteur hors ligne utilisé consiste d'un capillaire de silice fondue non désactivée possédant un diamètre interne de 530 μm et une longueur totale de 15 à 20 cm (volume de 30 à 40 μL). Le montage suivant a été utilisé pour l'injection des solutions utilisées pour toutes les réactions (*i.e.* réticulation et digestion) et les lavages hors ligne. Toutes les solutions ont été injectées en utilisant des pressions d'argon nécessaires appliquées à un vial muni d'un capillaire de transfert trempé dans la solution à injecter (fig. 8).

² Le volume et la concentration de la chymotrypsine réticulée ont été mesurés en considérant l'enzyme réticulée comme un soluté en suspension dans son milieu aqueux. Le volume indiqué est pipeté en agitant la suspension et en prélevant rapidement le volume voulu.

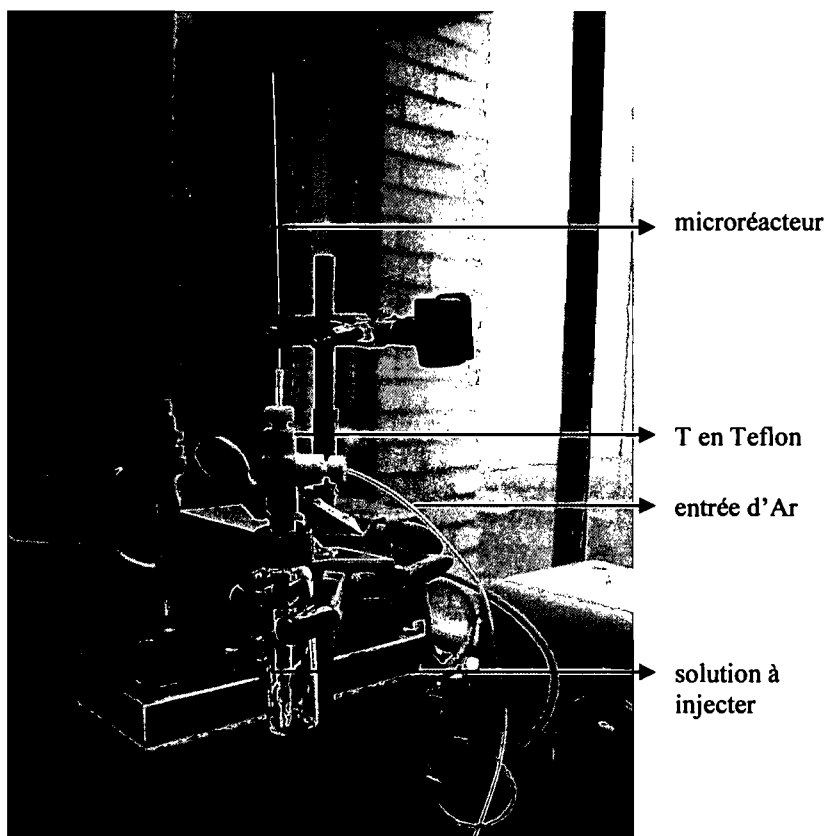


Figure 10. Montage du microréacteur hors ligne

2.3.6.1 Réticulation de la chymotrypsine dans le microréacteur

Dans un capillaire de 15 cm muni d'un frit à la sortie du capillaire et préalablement collé à 10 cm d'un capillaire de transfert, un mélange de 100 μL d'une solution de chymotrypsine 1.3 mM aq. et de 195 μL d'une solution de glutaraldéhyde 2.5% préparée dans une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ de pH 5.5 a été injecté rapidement peu après avoir mélangé les deux solutions. La réaction a été laissée pendant la nuit à 22°C. Un deuxième frit a alors été ajouté à l'entrée du microréacteur. Le microréacteur a ensuite été lavé avec la solution tampon de pH 5.5, une solution de glycine 200 mM, la solution tampon et de l'eau. L'eau a ensuite été injectée afin de remplir le capillaire et le microréacteur a été gardé à 4°C jusqu'à usage.

2.3.6.2 Immobilisation de la chymotrypsine réticulée au microréacteur

Une méthode d'immobilisation (e.g. ancrer) de la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde a été développée en suivant la procédure d'immobilisation de Torabi *et*

al.[56] avec quelques modifications. Tout d'abord, le 3-aminopropyltriéthoxysilane 10% v/v préparé dans une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM pH 4.0 a été injecté afin de remplir le capillaire de 20 cm et ce dernier a été laissé dans une étuve à 75°C pendant 4 h. Le microréacteur a alors été lavé avec de l'eau en injectant environ 200 μL de cette dernière. Les solutions de glutaraldéhyde et de chymotrypsine de différentes concentrations ont ensuite été injectées afin de remplir le capillaire et laissées réagir pour différentes périodes de temps. Le microréacteur a alors été lavé avec une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM pH 5.5, du NaCl 500 mM et avec la solution tampon précédente encore. Une solution de glycine 200 mM a ensuite été injectée et laissée réagir à 22°C pendant 2 h. Le microréacteur a finalement été lavé et rempli avec de l'eau et gardé à 4°C jusqu'à usage.

2.3.6.3 Digestion de HbA

La même procédure de dénaturation a été utilisée que dans la partie 2.3.1.2. Préalable à la digestion, la protéine a été diluée à 2 mg/mL dans une solution tampon de Tris-HCl 100 mM avec du CaCl_2 10 mM pH 7.8. La solution de HbA a alors été injectée dans le microréacteur afin de remplir le capillaire et laissée réagir pour différentes périodes de temps à 22°C. Les peptides ont alors été récupérés dans un tube de microcentrifugation de 0.6 mL et ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à son analyse par CZE.

2.3.7 Chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde dans le microréacteur en ligne

Le microréacteur en ligne utilisé consiste d'un capillaire de silice fondue non désactivée possédant un diamètre interne de 250 μm et une longueur totale de 60 cm. Le tout est installé dans une cartouche du système d'électrophorèse capillaire utilisé.

Les solutions utilisées pour les réactions et les lavages sont injectées par le système d'électrophorèse capillaire telles que détaillées dans les sections suivantes et une autre cartouche possédant un capillaire de diamètre interne de 50 μm a été utilisée pour la séparation des peptides.

2.3.7.1 Immobilisation de la chymotrypsine réticulée au microréacteur

La même procédure qu'à la section 2.3.6.1 a été utilisée mais modifiée pour son usage avec le système d'électrophorèse capillaire. Tout d'abord, le 3-APTS 10% v/v préparé dans une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM pH 4.0 a été injecté afin de remplir le capillaire et laissé réagir à 60°C pendant 5 h. Le microréacteur est alors lavé avec de l'eau et une solution 50% v/v contenant du GA 2.5% (diluée dans une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM pH 5.5) et de la chymotrypsine 0.65 mM a été injectée et laissée réagir pendant 2 h à 25°C. Le microréacteur est alors lavé avec une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM pH 5.5, du NaCl 500 mM et avec la solution tampon précédente encore. Une solution de glycine 200 mM est ensuite injectée et laissée réagir à 25°C pendant 2 h. Le microréacteur est finalement lavé et rempli avec de l'eau et gardé à 4°C jusqu'à usage.

2.3.7.2 Digestion de HbA

La même procédure de dénaturation a été utilisée que dans la partie 2.3.1.2. Préalable à la digestion, la protéine a été diluée à 2 mg/mL dans une solution tampon de Tris-HCl 100 mM avec du CaCl_2 10 mM pH 7.8. La solution de HbA est alors injectée et laissée réagir à 25°C. Les peptides sont alors récupérés à la sortie du capillaire et analysés par CZE dans un capillaire de 50 μm de d.i. en changeant la cartouche.

2.3.8 Quantification du glutaraldéhyde

2.3.8.1 Quantification de groupements aldéhydes du glutaraldéhyde non réagis sur la chymotrypsine réticulée

Lors de la réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde (section 2.3.5.1), 1.000 mL de tryptophane 26.79 mM a été ajouté au mélange réactionnel (au lieu de la glycine 200 mM) et a été laissé réagir pendant 3h à 22°C. Les surnageants ont été récupérés à la fin de la réticulation pour analyse.

2.3.8.2 Quantification du glutaraldéhyde restant dans les lavages

Un volume de 1.000 mL des surnageants prélevés après 2h de réaction trypsine-glutaraldéhyde (lors de la réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde, section 2.3.5.1) a été prélevé et a été ajouté goutte par goutte à 1.000 mL de tryptophane 24.42

mM. Le mélange a été laissé réagir pendant 48h à 22°C. Le surnageant a été prélevé pour analyse.

CHAPITRE 3

Réticulation des enzymes avec le glutaraldéhyde

Le comportement des enzymes immobilisées diffèrent des enzymes dissoutes à cause des effets du matériel de support, ou de la matrice, ainsi que des changements conformationnels de l'enzyme qui résulte des interactions avec le support et de modifications covalentes des résidus d'acides aminés. Les propriétés observées qui changent significativement lors de l'immobilisation incluent l'activité spécifique, le pH optimum, le K_M , la sélectivité et la stabilité[57]. Dans le cas idéal, l'enzyme immobilisée garderait tous les avantages d'une enzyme libre, tels que son activité catalytique spécifique et sa sélectivité, sans démontrer ses effets non voulus tel que son autolyse. Pour se faire, les conditions de réticulation et de digestion ont été étudiées pour la chymotrypsine réticulée. L'activité catalytique des enzymes réticulées a été évaluée et des cartes peptidiques de l'hémoglobine humaine ont été produites par électrophorèse capillaire.

3.1 Études des conditions de réticulation

La trypsine réticulée avec le glutaraldéhyde utilisée est préparée selon la méthode optimisée par Migneault[50] sans modifications. Par contre, lors de l'utilisation de cette même méthode pour la chymotrypsine, qui possède des propriétés similaires à la trypsine, le même résultat n'a pas été obtenu.

Tableau 1. Comparaison de la trypsine et de la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde lors de l'utilisation des conditions de réticulation de Migneault[50]

Caractéristiques	Trypsine réticulée	Chymotrypsine réticulée
Temps de précipitation	< 2 min	1 h
Couleur du précipité	rose	jaune
Morphologie du précipité	solide léger ^a	agrégats
Rendement de réticulation	>95%	90%

a : Le « solide léger » ressemble plutôt à une suspension où le solide précipite lentement au fond du tube.

Idéalement, le temps pris pour observer un précipité devrait être faible afin d'indiquer la favorisation de l'équilibre vers la réticulation de l'enzyme et pour diminuer le temps de toute la réaction. Le fait que le temps pris pour l'observation d'un précipité soit si élevé indique que l'équilibre n'est pas déplacé vers la réticulation. Le changement du rapport

de chymotrypsine:GA peut influencer cet équilibre selon le principe de Le Châtelier et selon la cinétique de la réaction. Le pH du milieu peut aussi influencer la réaction de réticulation puisqu'il permet le changement des charges des acides aminés changeant alors la conformation de l'enzyme pour faciliter ou empêcher sa réticulation par le glutaraldéhyde. La couleur du précipité jaunâtre peut aussi indiquer que le pH du milieu n'est pas idéal puisque cette coloration jaune pourrait être due à une certaine dénaturation de l'enzyme. Le rendement obtenu est légèrement plus faible que celui obtenu pour la trypsine réticulée ce qui peut indiquer que les conditions utilisées précédemment ne sont pas loin des conditions optimales. Donc, plusieurs caractéristiques, telles que le pH de la réticulation et le rapport GA:chymotrypsine, seront étudiées.

3.1.1 pH de réticulation

Plusieurs pH ont été utilisés pour la réticulation afin de déterminer le meilleur. Un rapport de 250:1 mol:mol de GA:chymotrypsine a été utilisé avec des concentrations finales de 2.86 mg/mL pour la chymotrypsine et 0.28% (m/v) pour le GA. Les solutions tampons préparées possédaient toutes des concentrations totales de l'acide faible avec sa base conjuguée de 50 mM. Les observations suivantes ont été faites à l'œil.

Tableau 2. Réticulation de la chymotrypsine à différents pH

Solution tampon	pH	Temps de précipitation	Précipitation après 2 h	Couleur de la solution
H ₃ PO ₄	2.2	---	Aucun précipité	Solution claire
H ₃ PO ₄ /NaOH	4.8	2 min	Peu de précipité	
CH ₃ COOH/CH ₃ COONa	5.5	< 2 min	Précipité blanc fibreux	
HOC(COOH)(CH ₂ COOH) ₂ /NaOH	6.0			
HOC(COOH)(CH ₂ COOH) ₂ /NaOH	6.2			
HOC(COOH)(CH ₂ COOH) ₂ /NaOH	6.4			
NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	6.6	> 10 min		Solution jaune
NaH ₂ PO ₄ /NaOH	6.8			
NaH ₂ PO ₄ /NaOH	6.9			
NaH ₂ PO ₄ /NaOH	8.0	< 90 min	Peu de précipité	
NaH ₂ PO ₄ /NaOH	8.8			

Le temps de précipitation indiqué est noté dès l'observation du moindre précipité et indique le début de la réaction de réticulation. En fait, un précipité a pu être observé surtout entre les pH 5.5 et 8.0. Par contre, entre les pH 5.5 et 6.6, il était possible de remarquer que la taille des précipités augmentait avec le pH et la solution devenait aussi de plus en plus jaune, ce qui peut indiquer une certaine dénaturation de l'enzyme. En fait, Regan *et al.*[58] ont remarqué lors de leurs expériences que la rétention de l'activité enzymatique était plus grande pour les petites particules. Pour confirmer que l'activité des grosses particules est limitée par la diffusion, ils ont utilisé un pilon et un mortier pour moudre les particules pour les réduire de taille et ils ont ensuite mesuré l'activité de ces dernières. L'activité des petites particules obtenues était plus élevée. Donc, afin de garder une petite taille de particules et pour éviter la possibilité d'une dénaturation de la chymotrypsine, il a été conclu que le pH optimal pour la réticulation est de 5.5 dans une solution tampon de CH₃COOH/CH₃COONa 50 mM.

Le rendement de réticulation a pu être déterminé en quantifiant par spectroscopie d'absorption la quantité de chymotrypsine restante dans les surnageants et les lavages prélevés à l'aide de solutions étalons (fig. 9).

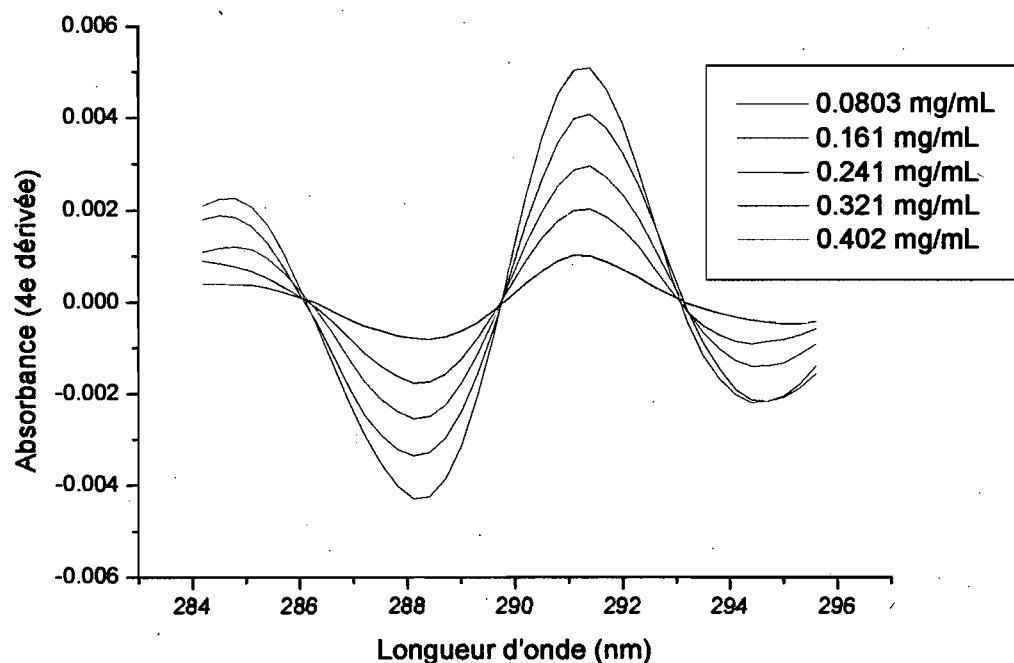


Figure 11. Spectres (4^e dérivée) d'absorption des solutions étalons de la chymotrypsine dans une solution tampon de pH 5.5

Les spectres de 4^e dérivée ont été utilisés pour minimiser, même éliminer, le signal d'absorbance provenant du glutaraldéhyde. Il est donc possible de voir que la chymotrypsine au pH 5.5 possède plusieurs minima à 288.4 et 294.4 nm ainsi que des maxima à 284.8 et 291.4 nm permettant sa quantification malgré la présence du GA dans les solutions. Le choix de la longueur d'onde pour l'étalonnage de la chymotrypsine à pH 5.5 était basé sur la corrélation, donc la linéarité, ainsi que la sensibilité (la pente), à différentes longueurs d'onde. Par la Figure 12, il est possible de voir que la longueur d'onde optimale pour l'étalonnage était de 291.4 nm.

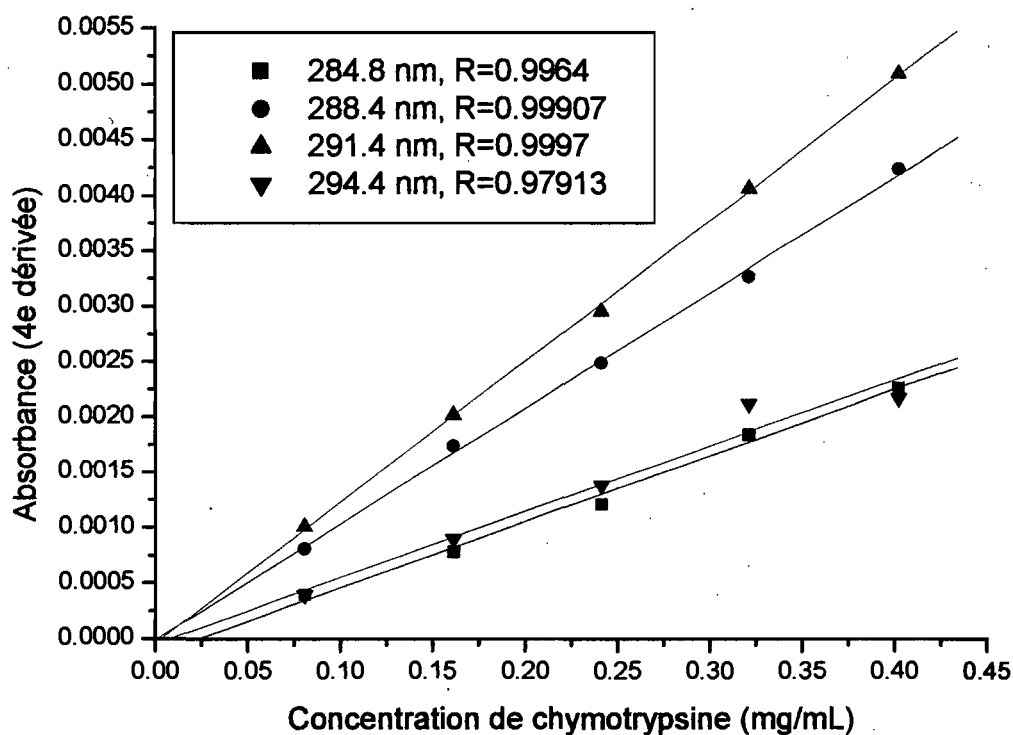


Figure 12. Courbes d'étalonnage de la chymotrypsine dans une solution tampon de pH 5.5 pour la détermination du rendement

En mesurant l'absorbance (4^e dérivée) des lavages faites lors de la réticulation, il est alors possible de calculer la concentration de chymotrypsine restante dans ces dernières avec la courbe d'étalonnage (fig. 10). Connaissant la quantité de chymotrypsine utilisée au départ, il est alors possible de calculer le rendement de réticulation qui est de 99.0% (Tableau 3), ce qui indique que la réaction de réticulation de la chymotrypsine au pH 5.5 est quasiment quantitative.

Tableau 3. Détermination du rendement de réticulation de la chymotrypsine au pH 5.5 en utilisant l'absorbance mesurée à $\lambda=291.4$ nm des lavages de la réticulation

	Absorbance mesurée ($\times 10^{-4}$)	Concentration de chymotrypsine (mg/mL)	Rendement de réticulation (%)
1	2.64	0.0234	98.9
2	2.42	0.0217	99.0
3	1.86	0.0173	99.2
Moyenne	---	---	99.0
Écart-type	---	---	0.2

3.1.2 Rapport molaire de GA:chymotrypsine

Afin de déterminer le meilleur rapport molaire de GA:chymotrypsine nécessaire, plusieurs critères ont été évalués, tels que le temps pour observer un précipité, pour pouvoir diminuer le temps de toute la réaction, ainsi que le rendement de la réaction de réticulation. Dans ce cas-ci, le temps pris pour l'observation du précipité a été noté lors de l'opacité complète de la solution indiquant une abondance de précipité comparativement à la réticulation de trypsine aux conditions optimales. Les rapports molaires de 25:1 à 500:1 (fig. 11) ont été évalués dans le pH optimal obtenu de 5.5 (voir section 3.1.1).

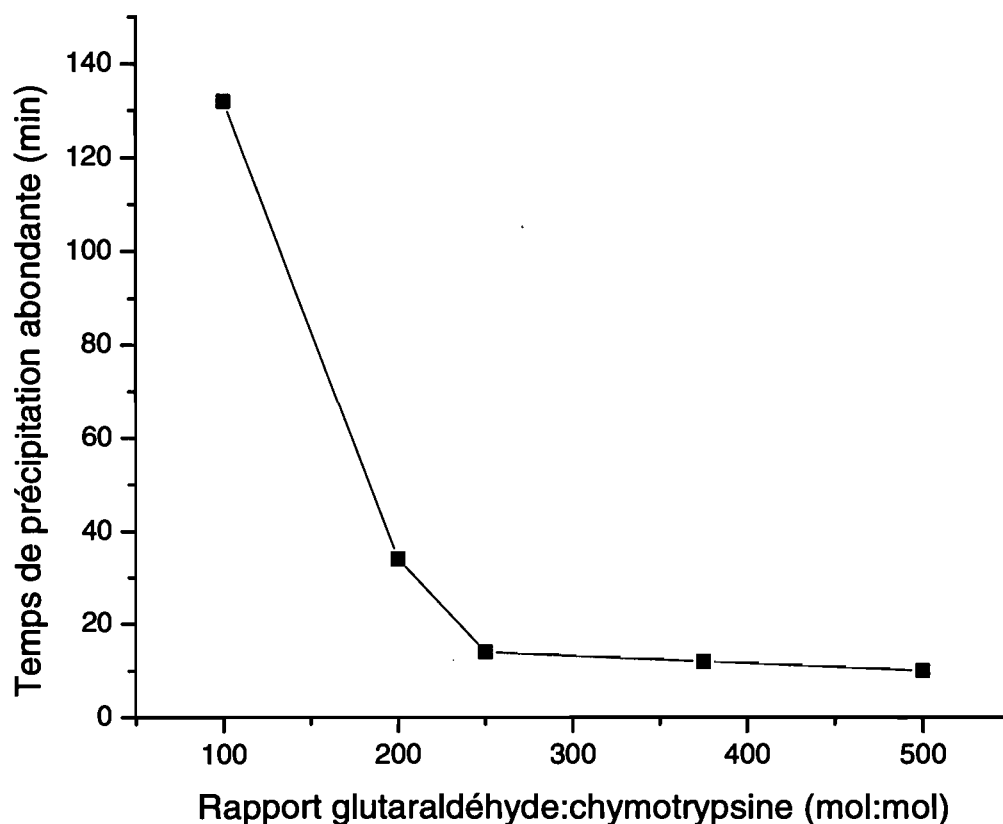


Figure 13. Temps observé pour obtenir un précipité selon le rapport glutaraldéhyde:chymotrypsine dans une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ au pH 5.5

Les rapports molaires de 25:1 et 50:1 de GA:chymotrypsine n'ont pas été inclus dans le dernier graphique puisqu'il n'y a pas eu de précipitation, et ce, même après deux heures et demie. Il est possible de voir que, à partir d'un rapport molaire de 250:1, la réticulation se fait en dessous de 20 minutes.

Les rendements des réticulations faites à plusieurs rapports molaires de GA:chymotrypsine ont été évalués en quantifiant la chymotrypsine restante dans les lavages par spectroscopie (fig. 13). À partir d'un rapport molaire de 250:1 de GA:chymotrypsine, la réaction est quasiment quantitative. L'utilisation d'un rapport de GA:chymotrypsine variant entre 250:1 et 500:1 semble être adéquate. Pour les études dans ce mémoire, un rapport molaire de 375:1 GA:chymotrypsine a été choisi.

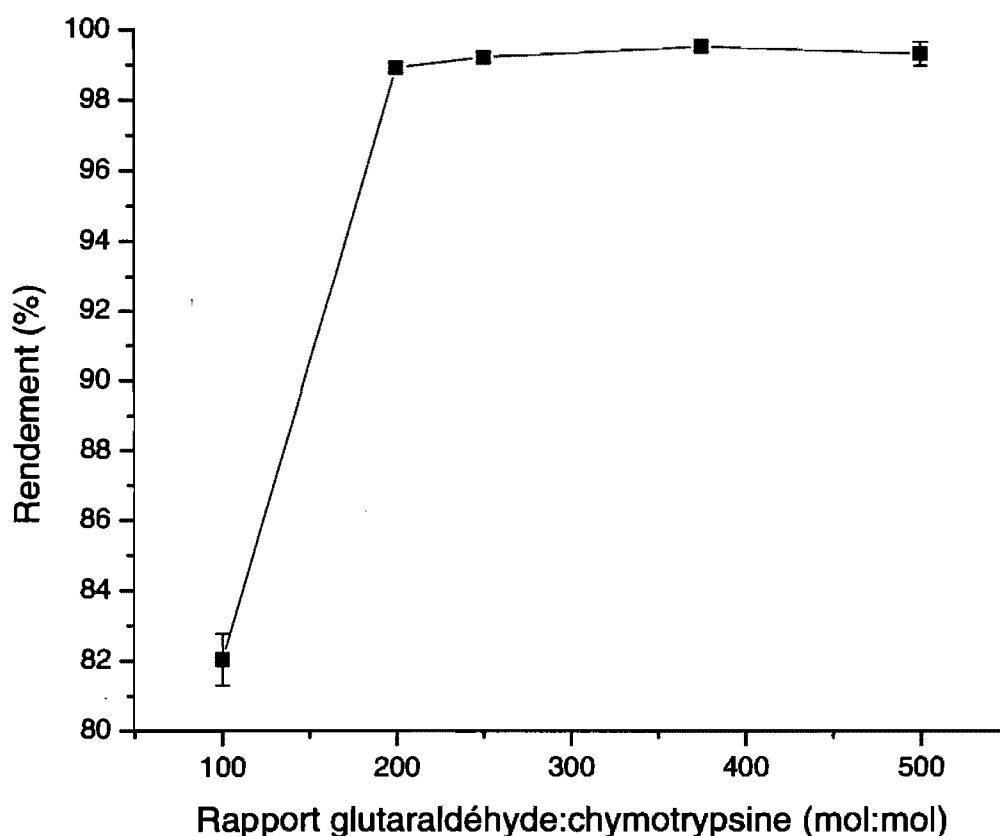


Figure 14. Rendement de la réticulation de la chymotrypsine selon le rapport glutaraldéhyde:chymotrypsine

Enfin, Jansen *et al.*[12] ont remarqué un maximum de précipitation (86%) au pH 6.2 et aucune précipitation à des pH inférieurs à 5.7 et à des pH supérieurs à 6.8, ce qui ne concorde pas avec les résultats obtenus lors de cette étude. Par contre, leur réaction de réticulation a été faite pendant 1 h à 0°C avec un rapport molaire de 2875:1 GA:chymotrypsine. En fait, quelques conditions de la réticulation n'ont pas été évaluées lors de cette étude, telles que la température de la réticulation et l'activité catalytique de l'enzyme réticulée selon la quantité de glutaraldéhyde ajouté. En utilisant une température moins élevée, on évite alors l'autolyse de l'enzyme. Par contre, le temps de réticulation peut être plus élevé puisque la cinétique de la réaction ne serait pas favorisée. De plus, Chui et Wan[59] ont établi que, lors de l'ajout d'une grande quantité de GA, il y a alors diminution de l'activité catalytique de l'enzyme puisque cette dernière subirait

une plus grande distortion à cause d'une réticulation plus extensive. Donc, un solide plus compact est beaucoup moins efficace et posséderait une activité catalytique moins grande. Pour ces raisons, nous avons décidé de garder un plus faible rapport GA:enzyme (e.g. 375:1) permettant quand même une réticulation rapide.

3.1.3 *Inactivation du GA*

La méthode choisie par Migneault[50] pour la désactivation du glutaraldéhyde non réagi avec l'enzyme lors de la réticulation est l'ajout de la glycine. En fait, Rho *et al.*[60] ont aussi utilisé la glycine pour bloquer les groupements aldéhydes non réagis lors de la réticulation avec le glutaraldéhyde. Par ailleurs, il est aussi possible d'utiliser le tris(hydroxyméthyl)aminométhane ou différentes petites molécules qui réagissent avec le glutaraldéhyde, telles que la lysine ou l'éthanolamine[21].

La glycine est une petite molécule qui réagit assez facilement avec le glutaraldéhyde. Par contre, elle n'absorbe pas comme d'autres acides aminés tels que la tryptophane, la tyrosine et le phénylalanine, et n'est donc pas facilement quantifiable par détection UV-visible. Pour le simple usage de la réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde, l'arrêt de la réaction par la glycine est suffisant. Par contre, il serait intéressant de faire des études pour essayer de déterminer la quantité de glutaraldéhyde restante, soit celle liée à l'enzyme et qui possèdent des groupements aldéhydes non réagis ainsi que celle qui reste dans les lavages avec l'enzyme non réticulée. Dans ces deux derniers cas, l'usage d'une petite molécule absorbante pour l'arrêt de la réaction, tel qu'un acide aminé possédant un ou plusieurs groupements aromatiques (tryptophane (W), tyrosine (Y) ou phénylalanine (F)), peut s'avérer utile pour la quantification du glutaraldéhyde (voir Chap. 5). L'utilisation d'un acide aminé aromatique, contrairement à la glycine, facilite sa détection. La spectrophotométrie d'absorption UV ou même l'électrophorèse capillaire munie d'un détecteur UV pourrait facilement être utilisée pour sa quantification. Le choix d'un acide aminé ou d'une molécule plus polaire que la glycine pourrait changer le comportement du produit réticulé final et donc son activité.

3.1.4 Procédure optimale de la réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde

Un volume de 0.200 mL de la chymotrypsine 1.3 mM aq. a été ajouté à 1.485 mL d'une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM pH 5.5 dans un tube de centrifugation de 2.0 mL. Ensuite, 0.390 mL d'une solution de GA 2.5% a été ajouté goutte par goutte dans le milieu réactionnel et le mélange a été laissé à t.p. pendant 2 h.

3.2 Caractéristiques des enzymes réticulées

Lors de la réticulation d'enzymes, il est important de les caractériser afin de pouvoir les comparer à d'autres enzymes immobilisées et afin de déterminer la reproductibilité de la réaction d'immobilisation. Lors de ces études, les activités catalytiques des enzymes libres et réticulées ont été déterminées pour voir l'effet de la réticulation sur son activité et la taille des particules a été mesurée.

3.2.1 Activité catalytique des enzymes

Le pH du milieu de réaction joue un gros rôle sur la conformation de l'enzyme et sur sa capacité de réagir avec le substrat. Au pH optimal de l'enzyme utilisée, son activité est supérieure à cause de sa conformation qui facilite et même améliore son interaction avec son substrat. En fait, le pH optimal est déterminé en mesurant son activité catalytique à plusieurs pH et les activités catalytiques sont reportées sur l'activité maximale au pH optimal. Le pH optimal pour la trypsine libre et réticulée avec le glutaraldéhyde a été déterminé par Migneault *et al.*[22].

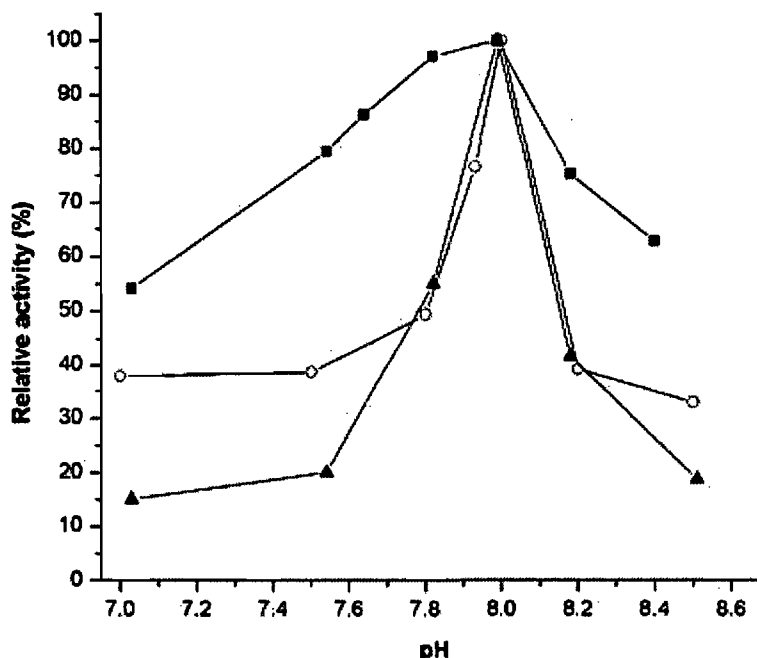


Figure 15. Effet du pH sur l'activité enzymatique relative de la trypsine libre (■), la trypsine réticulée avec le GA (▲) et la CPG-GA-trypsine (○)[22]

Il est possible de remarquer que le pH optimal pour la trypsine libre et réticulée est de 8.0. Aussi, la gamme optimale de pH pour la trypsine réticulée est plus étroite que pour la trypsine libre. Donc, lors d'une variation de 0.2 unités du pH optimal, il est possible de perdre jusqu'à 60 % de l'activité optimale.

Les activités spécifiques mesurées à pH 8.0 pour la trypsine libre et réticulées sont démontrées dans le tableau suivant.

Tableau 4. Comparaison des activités spécifiques de la trypsine libre et réticulée à pH 8.0[22]

Trypsine	K_M ou $K_{M,app}$ (mM)	V_{max} ou $V_{max,app}$ (mM/min)	Activité spécifique	
			U TAME/mg de trypsine	U BAEE/mg de trypsine ^{a)}
Libre	0.31	0.281	352	20 218
Réticulée	2.8	0.1	4.01	231

a) 1 U de TAME = 57.5 U de BAEE

Les propriétés apparentes ($K_{M,app}$ et $V_{max,app}$) sont utilisées dans le cas des enzymes réticulées puisque l'ensemble du comportement cinétique de l'enzyme est la somme de contributions isolées de chaque molécule individuelle d'enzyme, qui peut être réticulée via différents groupements amines exposant alors les sites catalytiques différemment[22]. Pour des comparaisons commerciales, le substrat ester d'éthyle de α -benzoyl-L-tyrosine (BAEE) est souvent utilisée pour la trypsine, mais ce dernier substrat peut se faire hydrolyser par la chymotrypsine et ainsi rester dans les préparations de trypsine disponibles sur le marché. Par contre, la chymotrypsine contaminante devrait être inhibée par la cétone de chlorométhyle de *N*-Tosyl-L-phénylalanyl (TPCK). (Il est à noter que des conditions saturantes d'enzyme ($[substrat] \geq 10 K_M$) n'ont pas été utilisées, ce qui peut diminuer la précision des résultats.)

Comme il est possible de voir, pour une même quantité d'enzyme, la trypsine libre possède une activité spécifique de plus de 85 fois supérieure à celle de la trypsine réticulée. Cet effet, la diminution de l'activité spécifique de l'enzyme réticulée, est souvent observée puisque les sites actifs sont moins accessibles au substrat et la diffusion des substrats et produits à travers les réseaux polymériques diminuent les valeurs apparentes de V_{max} et augmentent les valeurs de K_M [57].

Lors de l'étude de l'activité relative pour la chymotrypsine, donc en rapportant toutes les activités par rapport à l'activité obtenue au pH optimal, on n'obtient pas tout à fait le même pH optimal pour la chymotrypsine libre et réticulée comme illustre la Figure 16.

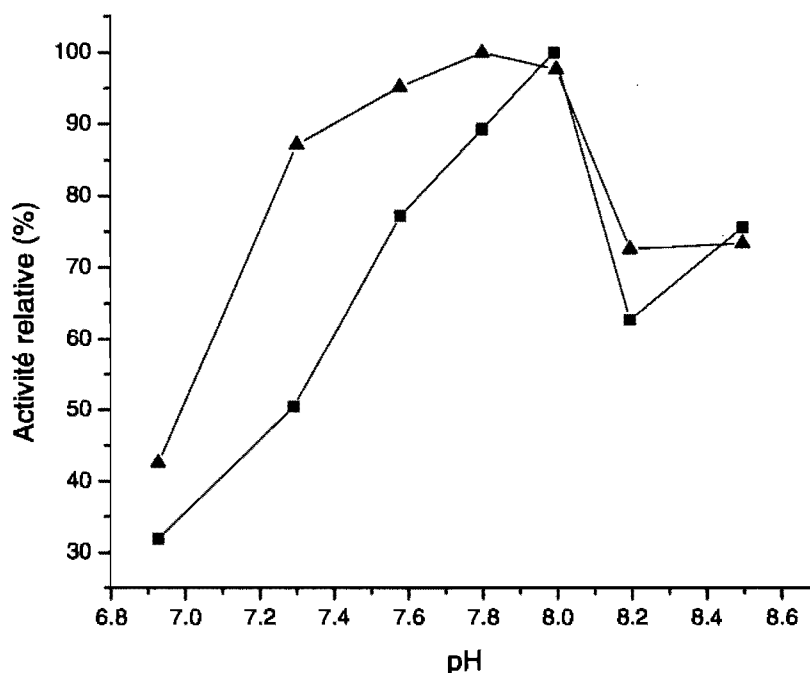


Figure 16. Effet du pH sur l'activité enzymatique relative de la chymotrypsine libre (■) et la chymotrypsine réticulée avec le GA (▲)

Le pH optimal observé pour la chymotrypsine libre est de 8.0, tandis que celui pour la chymotrypsine réticulée est de 7.8. Par contre, cet écart de 0.2 unité de pH est non significatif et peut simplement être dû à l'accumulation des incertitudes provenant des appareils utilisés et des calculs. Il est alors possible de dire, pour la chymotrypsine, que son pH optimal se situe entre 7.8 et 8.0.

En fait, dans ce cas-ci, on observe aussi que la gamme optimale de pH est plus étroite pour la chymotrypsine libre que pour la chymotrypsine réticulée, ce qui n'a pas été observé pour la trypsine. La chymotrypsine réticulée retient donc son activité catalytique optimale sur une plus grande gamme de pH que la chymotrypsine libre.

Par contre, il est possible d'observer la même diminution d'activité spécifique lors de la réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde que celle de la trypsine.

Tableau 5. Comparaison des activités spécifiques de la chymotrypsine libre et réticulée

Chymotrypsine	K_M ou $K_{M,app}$ (mM)	V_{max} ou $V_{max,app}$ (mM/min)	Activité spécifique
			U BTEE/mg de chymotrypsine
Libre	1.07	0.22	55
Réticulée	1.3	0.061	1.5

L'activité spécifique de la chymotrypsine réticulée est presque 40 fois moins grande que celle de l'enzyme libre. En fait, Jansen *et al.*[12] ont remarqué la diminution de l'activité catalytique de plusieurs enzymes réticulées au glutaraldéhyde, notamment celle de la chymotrypsine. Selon les supports utilisés, les changements conformationnels peuvent différer, mais l'effet obtenu, la diminution de son pouvoir catalytique, reste inchangé. En fait, Geng *et al.*[9] ainsi que Sears et Clark[61] ont remarqué la diminution de l'activité catalytique de la trypsine lors de son immobilisation. Habeeb[11] a remarqué le même effet lors de la réticulation de la trypsine au glutaraldéhyde lors de ses études. De plus, puisque le GA peut se polymériser afin d'obtenir même des oligomères[62], la probabilité que le site actif de l'enzyme utilisée soit encombré stériquement est grande. À cause de la grande stabilité du lien amino-glutaraldéhyde, il a même été suggéré que la formation d'un cycle soit très possible[14].

Par contre, il existe des méthodes qui peuvent être utilisées afin d'augmenter l'activité spécifique de l'enzyme réticulée ou immobilisée. Il est possible d'utiliser un espaceur, une molécule qui peut physiquement diminuer l'encombrement stérique que peut causer le glutaraldéhyde envers le site actif de l'enzyme. Geng *et al.* ont incorporé l'albumine sérum bovine (BSA) lors de l'immobilisation de la trypsine avec le glutaraldéhyde comme agent de réticulation afin de l'utiliser comme espaceur[9]. Ils ont obtenu la meilleure conservation d'activité (75.6%) lors de la présence du BSA lors de la réticulation de la trypsine avec le glutaraldéhyde. Nouaimi *et al.* ont étudié les effets de l'utilisation du diamine PEG, du dextran aldéhyde, du dextran amino et du BSA comme espaceurs sur l'immobilisation de la trypsine et ont remarqué que le BSA était le plus efficace[63].

Une autre méthode proposée pour augmenter l'activité d'une enzyme modifiée serait lors de l'ajout de son inhibiteur avant sa réticulation au glutaraldéhyde comme proposé par Beaven et Gratzer[54]. Selon ces derniers, lors de la présence de l'inhibiteur, la conformation autour du site actif de l'enzyme est stabilisée et la réticulation qui peut causer une distortion ne peut plus se faire. En fait, une petite étude sur l'ajout du benzamidine, un inhibiteur compétitif connu de la trypsine, lors de la réticulation de cette dernière au glutaraldéhyde a été faite et sera plus détaillée au Chapitre 4 de ce mémoire.

3.2.2 Morphologie des particules

La taille des particules et sa distribution peuvent grandement influencer l'efficacité des enzymes réticulées. La forme de la trypsine réticulée et celle de la chymotrypsine réticulée se ressemblent beaucoup. Il est possible de voir cette ressemblance à l'aide des deux figures suivantes observées sous un microscope optique de marque Stereomaster de Fisher Scientific.

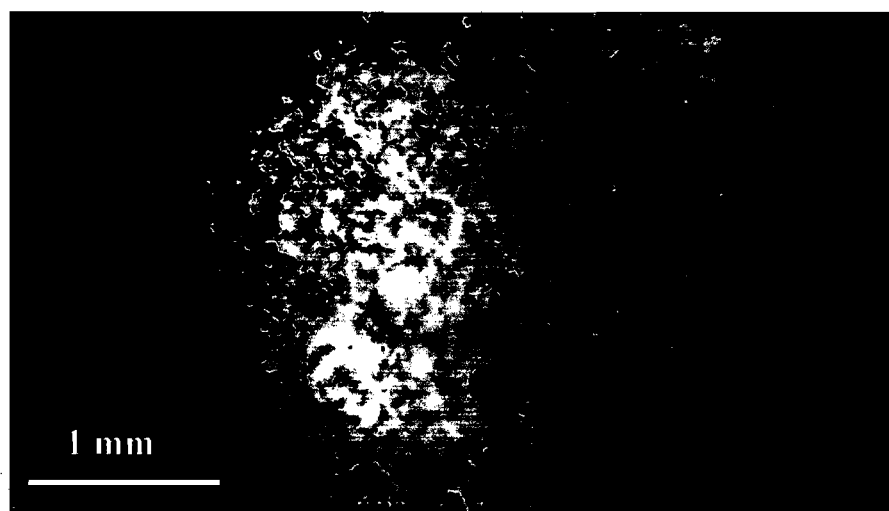


Figure 17. Photo de la trypsine réticulée avec le glutaraldéhyde (agrandie 25 X)

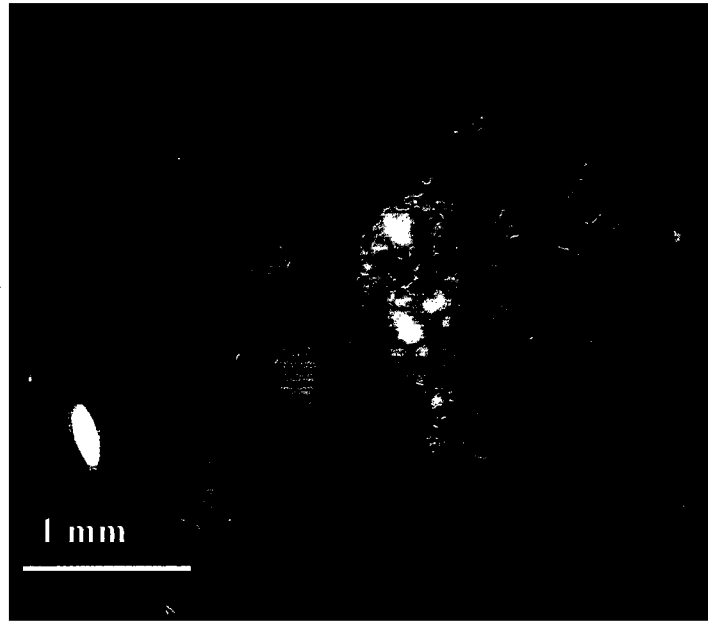


Figure 18. Photo de la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde (agrandie 20 X)

Il est à noter que ce ne sont pas des solutions fraîches qui ont été utilisées précédemment et les enzymes réticulées ont une tendance à former des agrégats avec le temps. En effet, les deux solides se ressemblent beaucoup. Par contre, la chymotrypsine réticulée semble avoir plus d'agrégats et est moins « fibreuse » que la trypsine réticulée. Il est possible de dire que le nombre de lysines présents peut affecter la réticulation. Par contre, la décroissance de lysines disponibles après la réaction de réticulation est une indication de l'étendue de la réaction mais pas nécessairement de l'étendue de la réticulation[64].

Les deux enzymes réticulées possèdent des distributions de taille assez similaires. En fait, il est possible de voir cette ressemblance par les figures suivantes obtenues par diffraction laser.

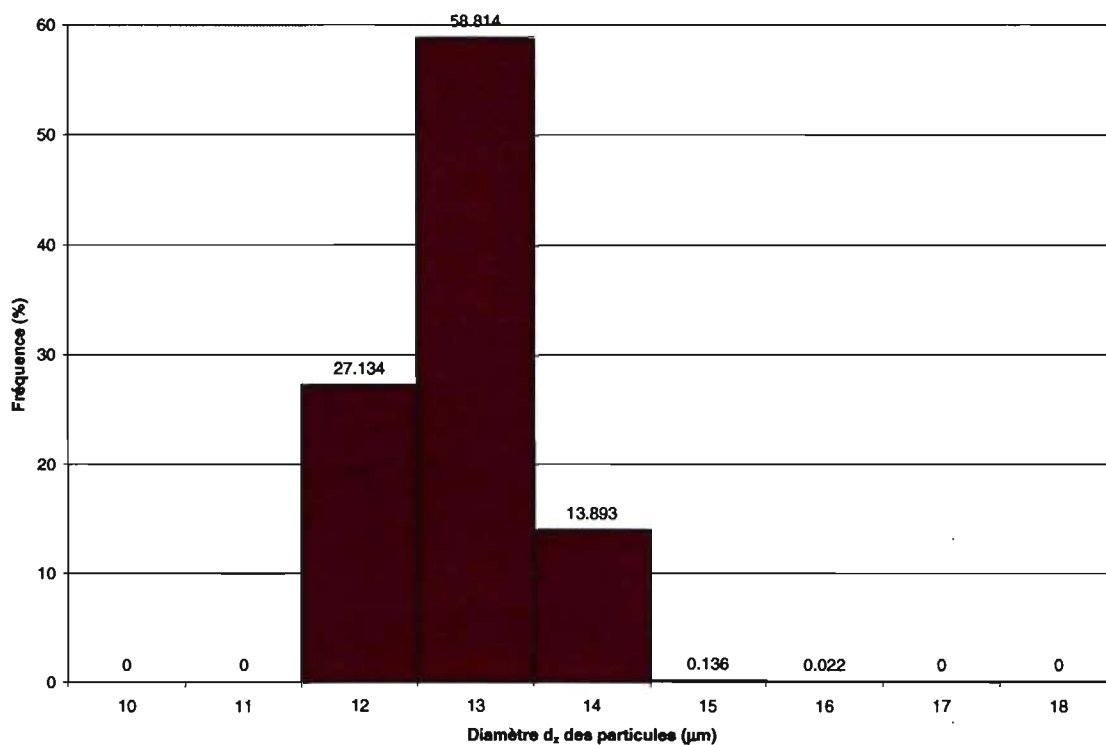


Figure 19. Distribution de taille des particules (d_z) de trypsine réticulée avec le glutaraldéhyde déterminée par diffraction laser

Il est possible de voir par l'histogramme illustré que la majorité de tailles des particules se situent entre 12 et 14 μm pour la trypsine réticulée.

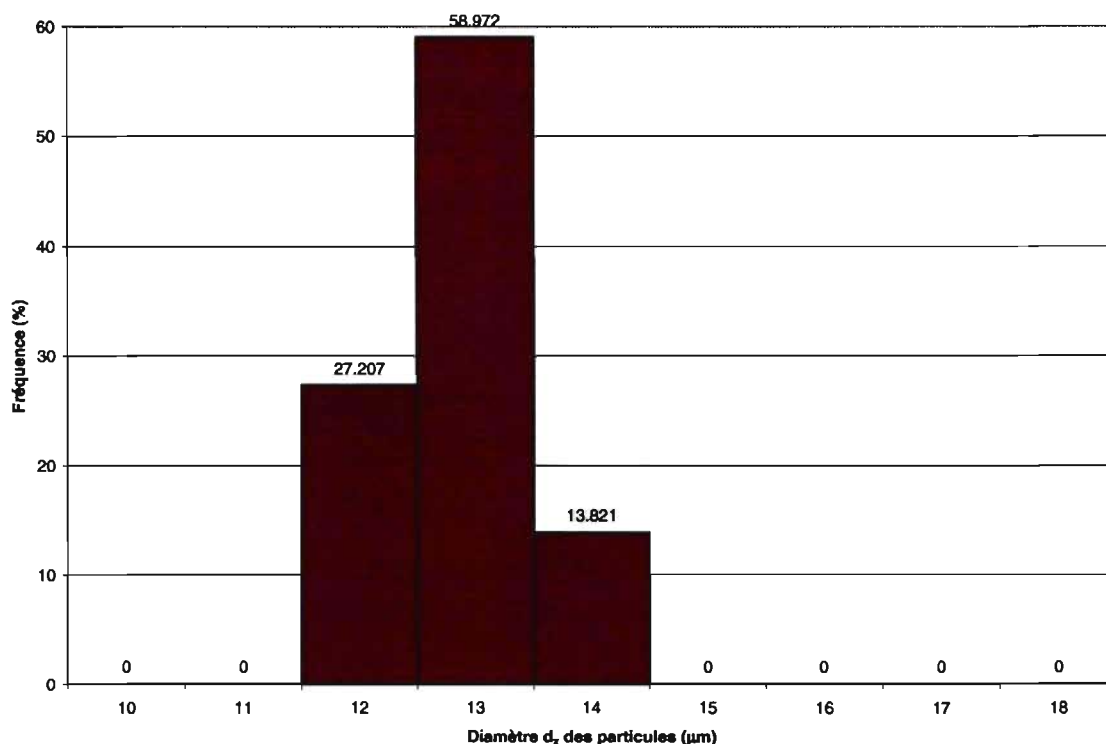


Figure 20. Distribution de taille des particules (d_z) de chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde déterminée par diffraction laser

Il est ainsi aussi pour la chymotrypsine réticulée. Il est à noter que des solutions fraîchement préparées ont été utilisées pour effectuer les analyses de taille des particules par diffraction laser. Dans ces derniers cas, les tailles des enzymes immobilisées sont plus uniformes que ce qui sont représentées sur les figures 17 et 18 montrant des grandes variances de taille. Il a été observé, dans les deux cas, que les enzymes réticulées avec le glutaraldéhyde ont tendance à former des agrégats avec le temps, surtout lorsque ces dernières restent au réfrigérateur pendant une longue période de temps.

Tableau 6. Distribution de taille des particules de trypsine et de chymotrypsine réticulées

Enzyme réticulée avec le GA	Taille moyenne (μm)
Trypsine	12.9 ± 0.6
Chymotrypsine	12.9 ± 0.6

La quantité de glutaraldéhyde utilisée pour la réticulation ainsi que le nombre de lysines présents dans la structure des enzymes protéolytiques influencent possiblement la

taille des particules. Par contre, il faut noter que le rapport molaire de glutaraldéhyde-enzyme utilisé est plus élevé pour la chymotrypsine réticulée (GA:chymotrypsine de 375:1) que celui utilisé pour la trypsine réticulée (GA:trypsine de 250:1) et on observe la même distribution de taille dans les deux cas. Il soit fort possible que le rapport de glutaraldéhyde:enzyme n'influence que le temps de voir une précipitation et n'augmente pas nécessairement la taille du solide obtenu. En fait, le nombre de lysines présents est égal dans les deux cas (*i.e.* 14 par enzyme), ce qui peut possiblement dire que le degré de réticulation soit égal dans les deux cas de réticulation avec le glutaraldéhyde. Donc, en étudiant la taille des particules, on ne peut que mettre l'emphasis sur l'importance de déterminer la quantité de glutaraldéhyde restante pour déterminer si elle influence la taille des particules ou l'activité de l'enzyme réticulée.

3.3 Utilisation des enzymes réticulées pour la cartographie peptidique

La capacité des enzymes réticulées avec le glutaraldéhyde de produire des cartes peptidiques détermine l'usage de celles-ci pour la caractérisation et l'identification des protéines. L'hémoglobine humaine (HbA) a été utilisée comme protéine substrat puisque cette dernière a été utilisée dans des études précédentes faites par Migneault *et al.*[22]. En fait, les deux cartes peptidiques obtenues sont similaires en faisant la comparaison des pics même si la trypsine réticulée possède une activité catalytique inférieure à la trypsine libre (fig. 19 et 20). (Il est à noter que le pic apparaissant à 1 min dans tous les électrophérogrammes du mémoire provient du système utilisé dû possiblement à l'inégalité des volumes à l'entrée et à la sortie du capillaire et ne fait pas partie des cartes peptidiques.)

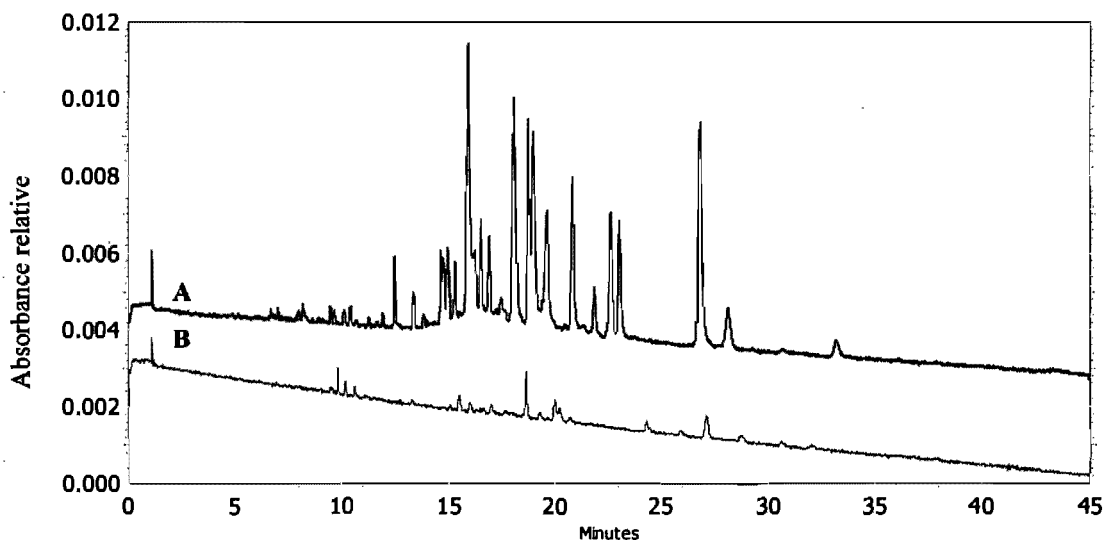


Figure 21. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la trypsine libre 1:25 p/p dans une solution tampon de NH_4HCO_3 50 mM pH 8.0 à 37°C pendant 4 h (A : avec substrat (HbA), B : sans substrat (blanc)); conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_1 = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

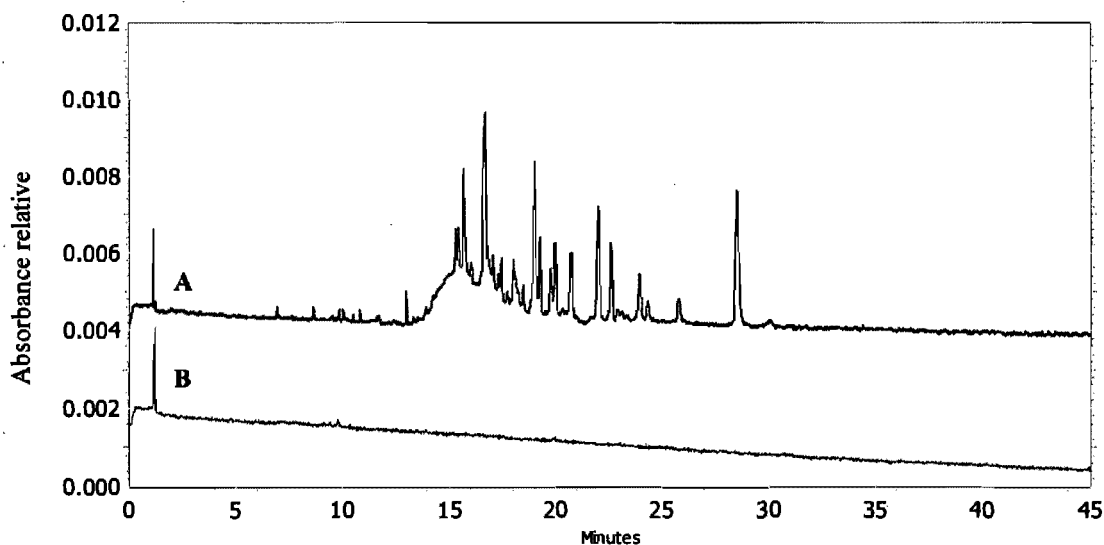


Figure 22. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la trypsine réticulée 1:25 p/p dans une solution tampon de NH_4HCO_3 50 mM pH 8.0 à 37°C pendant 4 h (A : avec substrat (HbA), B : sans substrat (blanc)); conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_1 = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Par contre, la petite modification au niveau du signal de fond obtenue vers 15 min (fig. 20) indique que la digestion tryptique n'est pas tout à fait complète. En fait, lorsqu'une analyse de l'hémoglobine humaine non digérée par électrophorèse capillaire a été faite

dans les mêmes conditions que pour la séparation des peptides tryptiques, il est possible de voir un gros pic dédoublé pour le HbA qui sort vers 15 à 20 minutes (fig. 21). (Son temps de migration peut varier légèrement à cause des légères différences sur les dimensions du capillaire et la solution tampon de séparation utilisés.)

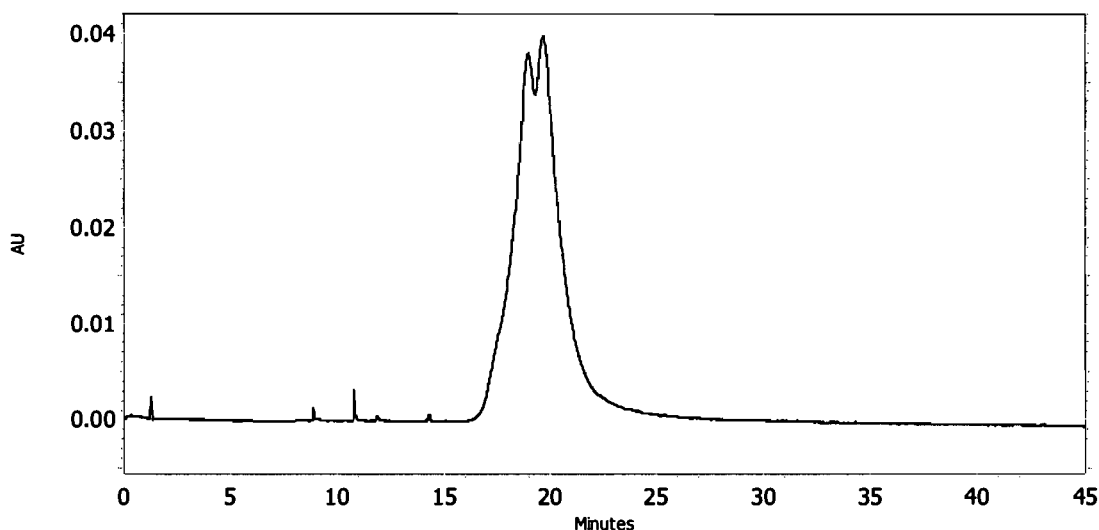


Figure 23. Électrophérogramme de HbA non digérée 8 mg/mL; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

On voit le même effet du substrat non digéré complètement pour la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde aussi (fig. 23) par rapport à la carte peptidique obtenue avec l'enzyme libre (fig. 22).

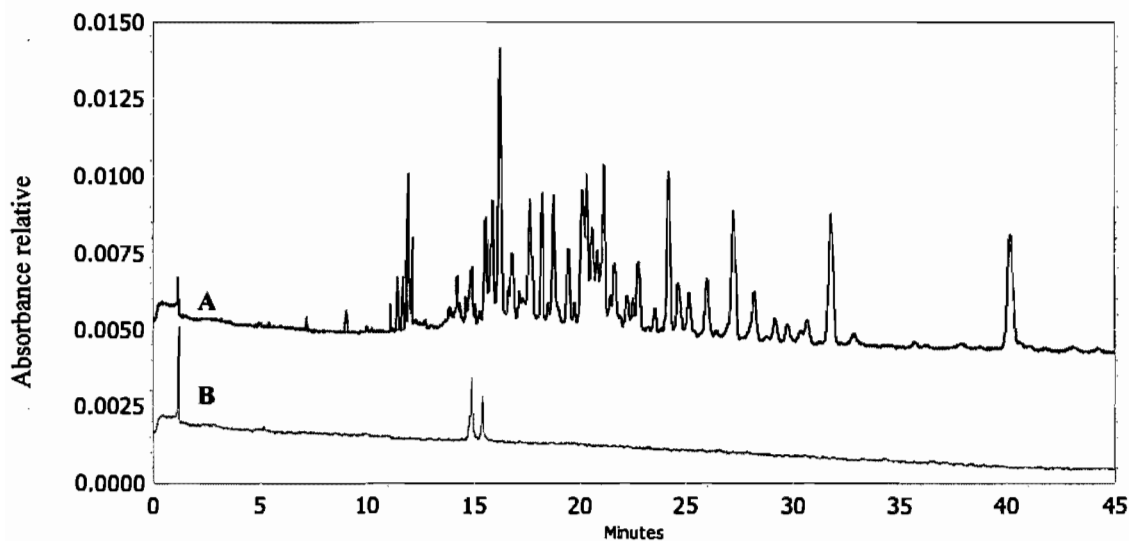


Figure 24. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la chymotrypsine libre 1:25 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h (A : avec substrat (HbA), B : sans substrat (blanc)); conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_1 = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

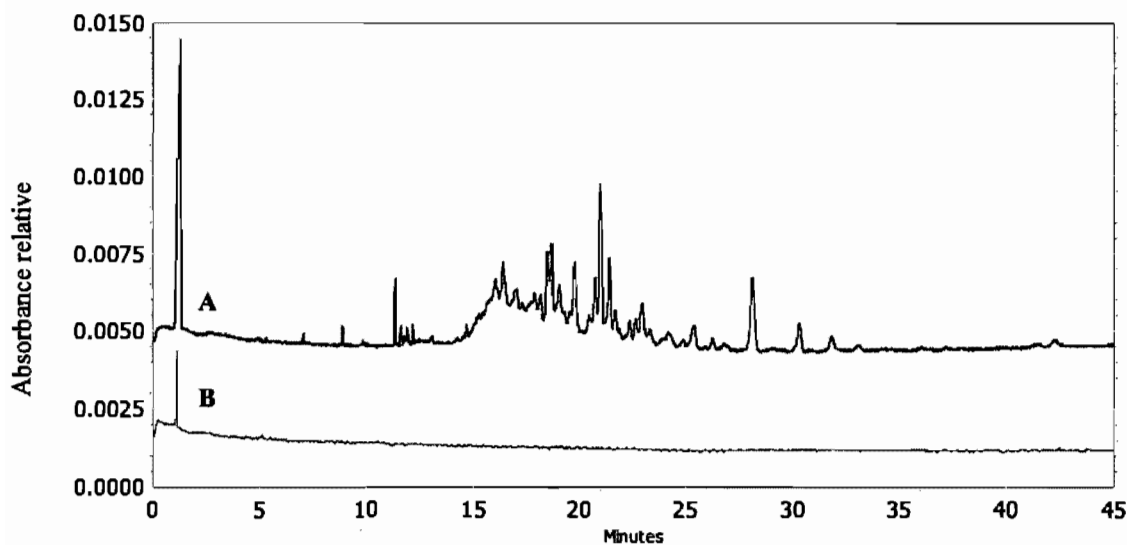


Figure 25. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la chymotrypsine réticulée 1:25 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h (A : avec substrat (HbA), B : sans substrat (blanc)); conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_1 = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Toutefois, il est possible de voir, par les électrophérogrammes pour les enzymes libres (fig. 19 et 22), qu'il y a des pics d'autolyse présents dans les blancs (sans substrat). Par contre, ceux-ci ne sont pas observables dans les blancs des électrophérogrammes des enzymes réticulées avec le glutaraldéhyde. Donc, il est possible de conclure que les enzymes réticulées avec le glutaraldéhyde sont plus stables et leurs conformations ne leur permettent pas de s'autodigérer puisque sa mobilité est minimisée.

Il est important de noter que les cartes peptidiques des enzymes libres peuvent contenir des activités enzymatiques « traces » qui viennent du fait que la réaction de digestion n'a pas été arrêtée mais l'échantillon a plutôt été simplement congelé à -20°C si pas analysé immédiatement après la réaction. En fait, à cette température, il peut avoir de dégradation étant donné que la température n'est pas assez basse pour désactiver toutes les enzymes[65]. Dans le cas de l'enzyme réticulée, on ne rencontre pas cet effet possible puisque l'enzyme est enlevée du milieu réactionnel.

La cartographie peptidique par MALDI-TOF-MS permet de confirmer l'identité de la protéine digérée. Les tableaux 7 et 8 montrent les séquences peptidiques du substrat utilisé, le HbA, digéré par la chymotrypsine réticulée (même échantillon que pour la carte peptidique au fig. 23).

Tableau 7. Peptides obtenus lors de la digestion du HbA (chaîne α) par la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde 1:25 p/p

[M+H]⁺ théorique (Da)	Position (numéro de résidu)	Nombre de clivage manqué	Séquence	[M+H]⁺ observé (Da)	Écart^{a)} (Da)	Précision de masse^{b)} (ppm)
547.2	44-47	0	FPHF			
988.5	16-25	0	GKVGAHAGEY			
1023.5	26-34	0	GAEALERMF	1023.5	0.0	0
1185.6	119-129	0	TPAVHASLDKF			
1268.7	130-141	0	LASVSTVLTSKY	1268.7	0.0	0
1630.9	1-15	0	MVLSPADKTNVK AAW			
1993.0	16-34	1	GKVGAHAGEYGA EALERMF	1992.5	0.5	251
2076.2	100-118	0	KLLSHCLLVTLAA HLP AEF			
5466.8	48-99	0	DLSHGSAQVKGH GKKVADALTNAV AHVDDMPNALSA LSDLHAHKLRVDP VNF			

a) L'écart est par rapport à la masse théorique.

b) La précision de masse est le rapport entre l'écart observé et la masse théorique $\times 10^6$, exprimée en ppm.

Tableau 8. Peptides obtenus lors de la digestion du HbA (chaîne β) par la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde 1:25 p/p

$[M+H]^+$ théorique (Da)	Position (numéro de résidu)	Nombre de clivage manqué	Séquence	$[M+H]^+$ observé (Da)	Écart ^{a)} (Da)	Précision de masse ^{b)} (ppm)
382.2	44-46	0	ESF			
480.2	120-123	0	GKEF			
551.3	39-42	0	TQRF			
846.4	124-131	0	TPPVQAAY	846.5	0.1	118
1307.7	120-131	1	GKEFTPPVQAAY	1307.8	0.1	76
1487.7	73-86	0	SDGLAHLNLTGTF			
1568.9	132-146	0	QKVVAGVANALAHKY			
1691.0	105-119	0	RLGNVLVCVLAHHF			
1705.9	132-147	1	QKVVAGVANALAHKYH	1705.8	0.1	59
1811.9	1-16	0	MVHLTPEEKSAVTALW			
2068.0	87-104	0	ATLSELHCDKLHVDPENF			
2370.3	17-38	0	GKVNVDVGGELGRLLVVYPW	2369.4	0.9	380
2637.4	47-72	0	GDLSTPDVVMGNPKVKAHGKKVLGAF			

a) L'écart est par rapport à la masse théorique.

b) La précision de masse est le rapport entre l'écart observé et la masse théorique $\times 10^6$, exprimée en ppm.

Comme il est possible de voir, par les tableaux 7 et 8 identifiant les masses des peptides obtenus, que les quelques masses observées par les spectres MALDI permet alors l'identification de l'hémoglobine humaine digérée par la chymotrypsine réticulée. Lors d'une digestion complète et spécifique, on devrait être en mesure d'obtenir 20 peptides et 3 acides aminés. Par contre, il est très difficile d'observer toutes les masses peptidiques. À cause des ions interférents provenant de la matrice, l'observation des pics de <900 Da

est presque impossible[66]. La qualité des spectres dépend aussi beaucoup de la préparation des échantillons : les étapes de purification et de préconcentration et le dépôt de l'échantillon avec la solution de matrice sur la plaque MALDI. En fait, une bonne partie des peptides de petites masses se perd lors des étapes de purification et de préconcentration. Les masses observées, par contre, permettent de conclure que la digestion de l'hémoglobine humaine par la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde a été relativement efficace.

Afin d'améliorer l'efficacité de la digestion, il est possible de simplement ajouter une plus grande quantité d'enzyme réticulée. De cette façon, il est possible d'obtenir une digestion enzymatique plus complète. En fait, les cartes peptidiques suivantes (fig. 24) illustrent l'efficacité et la reproductibilité de l'ajout de chymotrypsine réticulée sans compromettre les avantages de cette dernière (*i.e.* absence des pics d'autolyse). La quantité d'enzyme réticulée est cinq fois plus élevée par rapport à la figure 25.

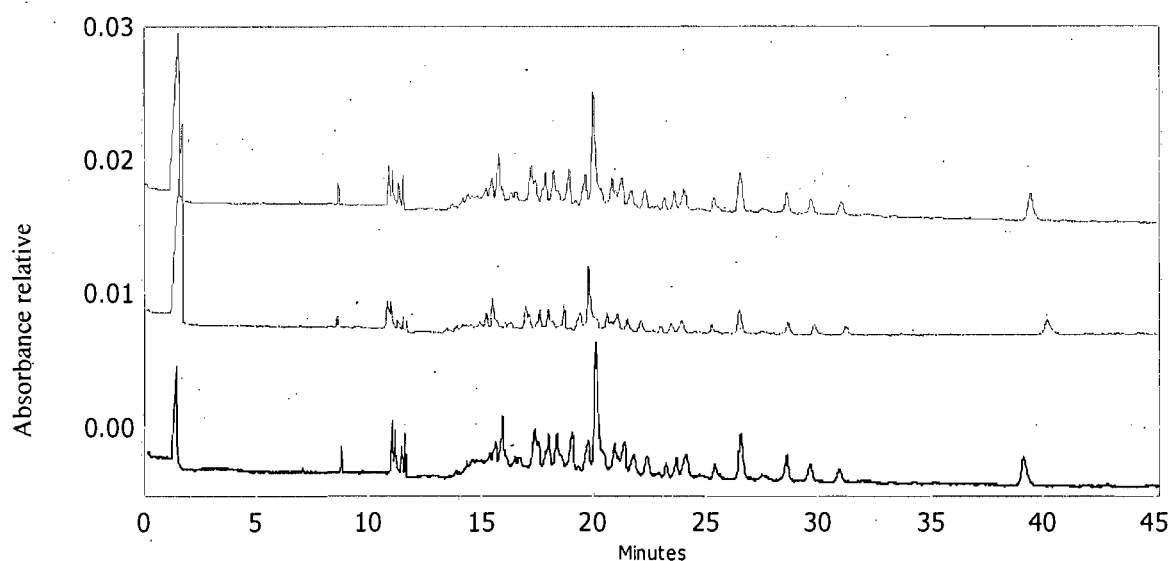


Figure 26. Cartes peptidiques de trois aliquots différents de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la chymotrypsine réticulée 1:5 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Il est possible de voir par la figure 26 que trois digestions différentes de HbA donnent des cartes peptidiques très reproductibles. En fait, trois analyses d'une même digestion

donnent aussi une telle reproductibilité. Le tableau 9 suivant démontrant l'écart-type relatif des temps de migration moyens pour quelques pics confirme cette reproductibilité.

Tableau 9. Reproductibilité des temps de migration CZE pour quelques pics des cartes peptidiques de trois aliquots différents de HbA dénaturée

Temps de migration moyen (min)	Écart-type relatif (%)
8.6	1.1
15.6	1.4
19.9	0.9
26.4	0.2
39.5	1.4

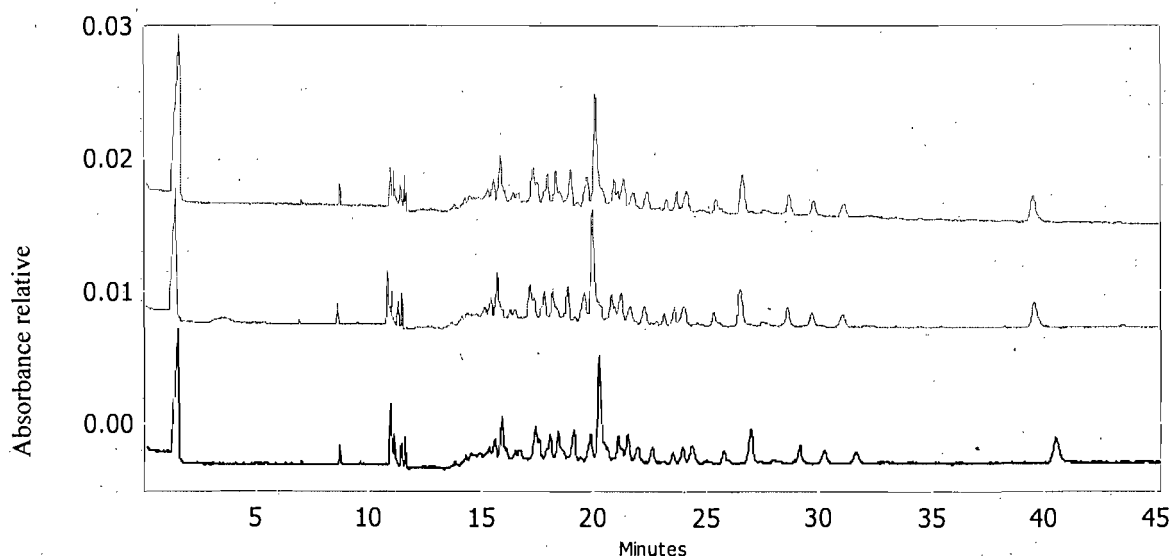


Figure 27. Cartes peptidiques d'une même digestion de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par la chymotrypsine réticulée 1:5 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Le tableau 10 confirme la reproductibilité des cartes peptidiques des injections faites en triplicata dans l'appareil CZE (fig. 25).

Tableau 10. Reproductibilité des temps de migration CZE pour quelques pics des cartes peptidiques de la même digestion de HbA dénaturée

Temps de migration (min)	Écart-type relatif (%)
8.5	0.3
15.5	0.7
19.8	0.6
26.5	0.3
40.0	0.4

Pour la cartographie peptidique, il est essentiel que la réticulation de l'enzyme soit aussi reproductible. La figure suivante démontre deux digestions de HbA par deux préparations de chymotrypsine réticulée différentes mais avec le même lot et la même activité de départ de la chymotrypsine cristalline.

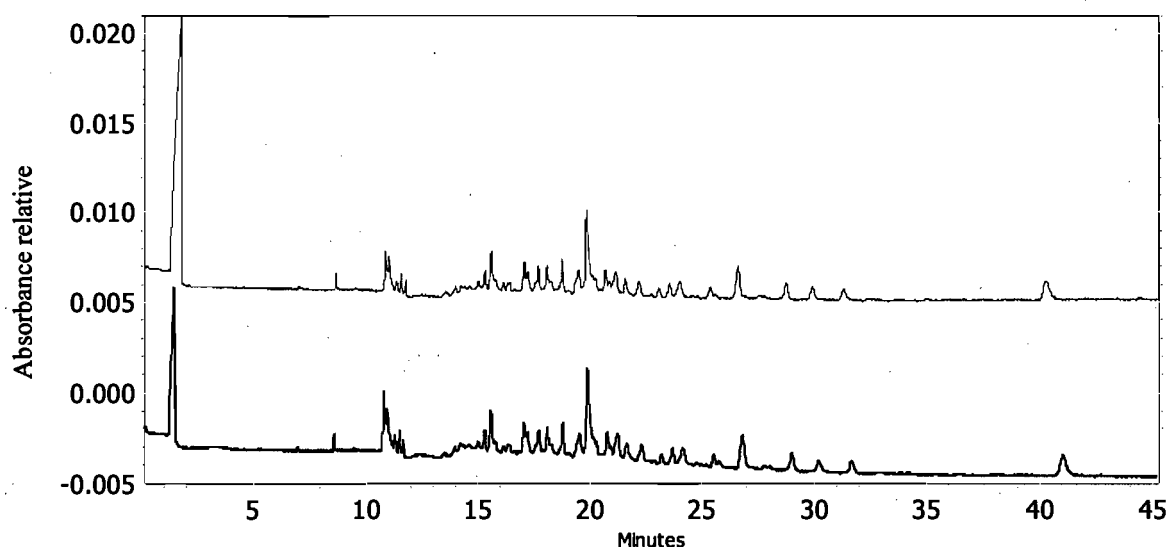


Figure 28. Cartes peptidiques de deux digestions de HbA dénaturée 2 mg/mL puis digérée par deux préparations différentes de chymotrypsine réticulée 1:5 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

En effet, il est possible de voir que deux préparations de chymotrypsine réticulée peuvent donner deux cartes peptidiques très similaires et reproductibles.

Ayant une digestion améliorée et plus complète, on s'attend alors à observer plus de masses par MALDI-TOF-MS, ce qui a été observé (tableaux 11 et 12).

Tableau 11. Peptides obtenus lors de la digestion du HbA (chaîne α) par la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde 1:5 p/p

$[M+H]^+$ théorique (Da)	Position ^{a)}	Nombre de clivage manqué	Séquence	$[M+H]^+$ observé (Da)	Écart ^{b)} (Da)	Précision de masse ^{c)} (ppm)
547.2	44-47	0	FPHF			
988.5	16-25	0	GKVGAHAGEY			
1023.5	26-34	0	GAEALERMF	1023.4	0.1	98
1039.5	26-34 33 MSO	0	GAEALERMF	1039.4	0.1	96
1185.6	119-129	0	TPAVHASLDKF			
1268.7	130-141	0	LASVSTVLTSKY	1268.8	0.1	79
1630.9	1-15	0	MVLSPADKTNVK AAW			
1993.0	16-34	1	GKVGAHAGEYGA EALERMF	1992.4	0.6	301
2062.0	26-43	1	GAEALERMFLSFP TTKTY	2061.4	0.6	291
2076.2	100-118	0	KLLSHCLLVTLAA HLP AEF			
3242.8	100-129	1	KLLSHCLLVTLAA HLP AEF TPAVHAS LDKF	3242.2	0.6	185
5466.8	48-99	0	DLSHGSAQVKGH GKKVADALTNAV AHVDDMPNALS LSDLHAHKLRVDP VNF			

a) MSO : Méthionine sulfoxide, PyroG : Acide pyroglutamique

b) L'écart est par rapport à la masse théorique.

c) La précision de masse est le rapport entre l'écart observé et la masse théorique $\times 10^6$, exprimée en ppm.

Tableau 12. Peptides obtenus lors de la digestion du HbA (chaîne β) par la chymotrypsine réticulée avec le glutaraldéhyde 1:5 p/p

$[M+H]^+$ théorique (Da)	Position ^{a)}	Nombre de clivage manqué	Séquence	$[M+H]^+$ observé (Da)	Écart ^{b)} (Da)	Précision de masse ^{c)} (ppm)
382.2	44-46	0	ESF			
480.2	120-123	0	GKEF			
551.3	39-42	0	TQRF			
846.4	124-131	0	TPPVQAAY	846.4	0.0	0
1307.7	120-131	1	GKEFTPPVQAA Y	1307.7	0.0	0
1487.7	73-86	0	SDGLAHLNLK GTF	1487.7	0.0	0
1568.9	132-146	0	QKVVAGVANAL AHKY			
1688.9	132-147 137 PyroG	1	QKVVAGVANAL AHKYH	1688.8	0.1	59
1691.0	105-119	0	RLLGNVLVCVL AHHF			
1705.9	132-147	1	QKVVAGVANAL AHKYH			
1811.9	1-16	0	MVHLTPEEKSA VTALW			
2068.0	87-104	0	ATLSELHCDKLH VDPENF			
2370.3	17-38	0	GKVNVEVGGE ALGRLLVVYPW	2369.2	1.1	464
2637.4	47-72	0	GDLSTPDVAVMG NPKVKAHGKKV LGAF			

a) MSO : Méthionine sulfoxyde, PyroG : Acide pyroglutamique

b) L'écart est par rapport à la masse théorique.

c) La précision de masse est le rapport entre l'écart observé et la masse théorique $\times 10^6$, exprimée en ppm.

En utilisant plus d'enzyme réticulée pour une masse de substrat donné, il est possible d'obtenir une digestion plus complète. En effet, on observe alors plus de masses par MALDI par rapport à la digestion par la chymotrypsine réticulée 1:25 p/p

enzyme:substrat. En fait, puisque l'utilisation d'une plus grande quantité d'enzyme réticulée permet une digestion plus complète et ne laisse aucun pic d'autolyse, il est alors possible d'utiliser plus d'enzyme pour améliorer la digestion. Ye *et al.* ont utilisé une plus grande concentration de trypsine immobilisée pour leur microréacteur afin d'obtenir une activité de 86 fois plus élevée que celle de la trypsine libre (l'activité spécifique de la trypsine immobilisée était 22% de celle de la trypsine libre)[36].

Donc, une méthode pour la réticulation de la chymotrypsine a été développée et son utilisation pour la digestion de l'hémoglobine humaine (HbA) montre alors que son usage serait possible dans un microréacteur. Comme prévu, l'augmentation de la quantité d'enzyme réticulée génère de meilleures cartes peptidiques, donc des digestions plus complètes. Pour la fabrication des microréacteurs, il serait mieux d'utiliser une plus grande quantité d'enzyme puisque le but serait de pouvoir obtenir des digestions ne durant que de quelques minutes ou même de quelques secondes. Parallèlement, des études sur l'augmentation de l'activité de la trypsine réticulée ont été étudiées puisque la trypsine réticulée possède une activité catalytique moins grande que sa version native. L'ajout d'un inhibiteur réversible serait une option possiblement favorable afin de garder la conformation optimale de l'enzyme pour la digestion. Ces études seront détaillées dans le prochain chapitre.

CHAPITRE 4

Effet du benzamidine sur l'activité catalytique de la trypsine
réticulée

Une façon d'améliorer l'activité spécifique, comme faite par Beaven et Gratzer[54], est d'ajouter un inhibiteur réversible avant la réticulation de l'enzyme. L'objectif de cette approche est de conserver la conformation de la trypsine par l'insertion de l'inhibiteur dans son site actif afin d'améliorer l'activité catalytique de l'enzyme. En fait, ils ont choisi d'ajouter le benzamidine, un inhibiteur connu de la trypsine, avant la réticulation de la trypsine avec le glutaraldéhyde et ont remarqué une augmentation de l'activité esterase du solide obtenu lorsque des mesures cinétiques ont été faites avec le substrat TAME (ester de méthyle de *N*- α *p*-tosyl-L-arginine).

Le benzamidine (fig. 27) est un inhibiteur réversible compétitif.

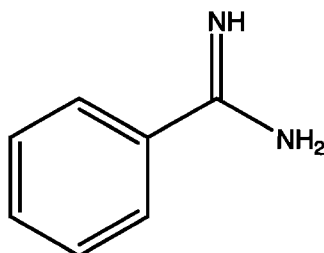


Figure 29. Structure du benzamidine

Les études sur différents amidines comme inhibiteurs compétitifs de la trypsine faites par Tanizawa *et al.*[67] indiquent que le site anionique de la trypsine qui attire les acides aminés cationiques du substrat, la lysine et l'arginine, requiert une conformation stérique assez stricte. Selon les études faites sur le centre actif de la trypsine faites par Mares-Guia et Shaw[68], il existe un site hydrophobique en forme de fente ou de fissure dans le site actif de la trypsine localisé entre le site anionique et le site catalytique qui lie les chaînes latérales carbonées des substrats ou des inhibiteurs comme l'illustre la figure suivante.

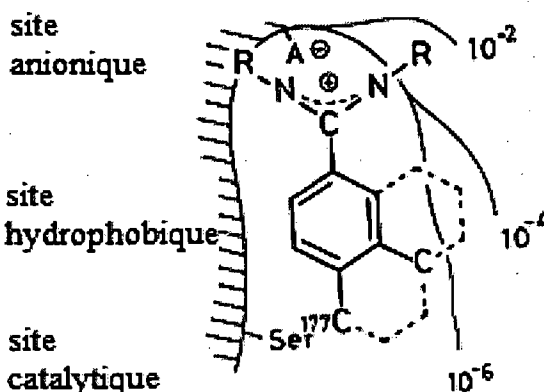


Figure 30. Schéma montrant le comportement des amidines aromatiques envers le site actif de la trypsine. Les lignes de contour avec les valeurs respectives de K_i indiquent les exigences stériques du site actif[67].

Le tableau suivant (tableau 13) liste les amidines étudiées par Tanizawa *et al.*[67] et aide à expliquer les valeurs de K_i indiquées au fig. 28.

Tableau 13. Inhibition compétitive de la trypsine par des amidines[67]

Amidine	K_i (M)
I. Benzamidine	$(1.90 \pm 0.10) \times 10^{-5}$
II. <i>N</i> -Methylbenzamidine	$(1.44 \pm 0.35) \times 10^{-2}$
III. α -Naphthamidine	$(2.43 \pm 0.10) \times 10^{-4}$
IV. β -Naphthamidine	$(6.60 \pm 0.32) \times 10^{-6}$

L'ajout d'un méthyl, comme dans le cas de l'inhibiteur II, diminue son K_i à 10^{-2} . La ligne de 10^{-4} démontre l'orientation défavorisée de l'inhibiteur III. La ligne de 10^{-6} suggère que l'inhibiteur IV possède la meilleure structure et est supposé représenter la forme approximative du site actif de la trypsine native[67].

En fait, les intensités des cartes de densité électronique de Krieger *et al.*[69] démontrent que le benzamidine se lie seulement dans un seul site comparativement à d'autres sérine protéases pancréatiques et que le cation amidinium du benzamidine interagit avec le groupe carboxylique chargé négativement de l'acide aspartique 189 de la trypsine. Les valeurs des constantes d'inhibition, K_i , du benzamidine dans différentes conditions, selon la littérature, ont été récoltées dans le tableau suivant.

Tableau 14. Inhibition de la trypsine par le benzamidine

Auteurs	pH	Température (°C)	K _i (M)
Mares-Guia et Shaw[68]	8.15	15.0	1.84×10^{-5}
Béchet et D'Albis[70]	6 à 8	10	$(2.7 \pm 0.5) \times 10^{-5}$
Tanizawa <i>et al.</i> [67]	8.2	25	$(1.90 \pm 0.10) \times 10^{-5}$

Puisque la trypsine a une forte affinité au benzamidine (K_i de l'ordre de 10^{-5} M), ce dernier est souvent utilisé afin de garder la conformation optimale de la trypsine et la prévenir l'autolyse. En fait, plusieurs facteurs peuvent causer l'autolyse ou la dégradation de l'enzyme. L'enlèvement des protéines de leur environnement cellulaire leur sujette à une variation de conditions et processus (des dilutions, des changements des conditions de solutions, leur exposition à des enzymes dégradatives, l'oxygène, des métaux lourds, des surfaces et des changements de leur condition physique (*i.e.* la congélation et la décongélation)) qui peuvent amener à une perte d'activité ou une altération de leur structure[71]. L'inclusion d'inhibiteurs dans des solutions durant et après la disruption du tissu (lors de l'isolation de l'enzyme) représente la solution la plus favorable pour un problème de protéolyse non voulue[72]. Donc, afin de pouvoir utiliser le benzamidine pour conserver la conformation optimale de la trypsine lors de la réticulation, il faut d'abord déterminer le pH optimal de la réticulation en présence du benzamidine, ensuite, quantifier la trypsine et le benzamidine afin de déterminer le rendement de la réaction de réticulation et, enfin, voir le pouvoir de digestion de la trypsine inhibée réticulée.

4.1 pH optimal de la réticulation

D'abord, quelques études préliminaires ont été faites pour vérifier s'il était bien possible d'obtenir un produit insoluble lors de l'inhibition et, ensuite, la réticulation de la trypsine. Pour ce faire, la méthode d'inhibition et de réticulation de Beaven et Gratzer[54] a été suivie en effectuant, en même temps, quelques études à d'autres pH incluant le pH de réticulation de Migneault *et al.*[22] de 6.8. Le tableau 15 montre des précipitations observées.

Tableau 15. Inhibition et réticulation de la trypsine dans différentes solutions tampons et à différents pH pour un rapport trypsine:benzamidine de 1:900

Solution tampon	pH	Observation après 2h*
NaH ₂ PO ₄ 50 mM	6.8	Précipité blanc relativement faible
NaH ₂ PO ₄ 50 mM	8.0	Précipité blanc relativement faible
NaH ₂ PO ₄ 50 mM	8.8	Précipité blanc relativement moyen
Na ₂ CO ₃ 0.5%	10.7	Précipité blanc relativement élevé

* L'observation a été faite par rapport aux autres solutions. Une précipitation relativement élevée est constituée d'au moins 30% de précipité par rapport au volume total de la solution.

Les pH 8.0 et 8.8 ont été choisis aussi lors de ces études préliminaires puisque Migneault[50] a observé deux différents types de précipitation lorsqu'elle a fait ses études sur l'effet du pH sur la précipitation de la trypsine par réaction avec GA à ces deux derniers pH. En fait, il était possible d'observer beaucoup de précipitation aux pH 8.8 et 10.7. Par contre, au pH 10.7, une plus grande quantité de précipité a été observée. Des études faites plus tard dans notre groupe par Santiagos[55], dans des milieux plus concentrés en trypsine et en benzamidine, comparant la précipitation au pH 8.5 dans une solution tampon phosphate et au pH 10.5 dans une solution tampon carbonate confirment cet effet. Il est alors possible de dire que, en présence de benzamidine, la trypsine subit une modification de sa structure qui modifie alors son pH optimal de réticulation à des pH plus élevés.

Ceci peut être dû au fait que le groupement ε-amine de la lysine possède un pK_a de 10.54[2] et que, en effectuant la réaction de réticulation à des pH plus élevés, il est possible d'avoir plus de groupements amines non protonés capables de réagir avec le glutaraldéhyde comme expliqué précédemment (voir section 3.2.1 dans chap. 3). En fait, Migneault[50] n'a pas pu observer de précipitation à des pH plus élevés probablement à cause de la dénaturation de la trypsine à des pH élevés (et non à cause de la condensation aldolique du glutaraldéhyde) puisque la trypsine n'est pas du tout dans sa gamme de pH optimale, donc de 7 à 9[73]. Mais, dans ce cas, en ayant le benzamidine pour la stabiliser à des pH élevés, la trypsine peut conserver sa conformation optimale en effectuant la réticulation avec le glutaraldéhyde. Par contre, le fait que la trypsine inhibée se réticule avec le glutaraldéhyde plus efficacement à des pH élevés ne caractérise aucunement

l'efficacité de l'interaction trypsine-benzamidine. Il soit fort possible que, en effectuant les réactions d'inhibition et de réticulation à des pH plus élevés, l'affinité de la trypsine envers le benzamidine soit moins grand puisque le benzamidine possède un pK_a de 11.8 ± 0.2 à 15°C [70] et sa forme amidinium, chargée positivement, a été prouvée de jouer un rôle dans son attachement dans le site actif de la trypsine qui est chargé négativement. Donc, ceci renforce aussi le besoin de quantifier le benzamidine et la trypsine non réagis afin de déterminer l'efficacité de la réaction de l'enzyme en présence de l'inhibition.

4.2 Quantification du benzamidine et de la trypsine

En fait, lors des études par spectrophotométrie UV, les résultats ont été peu concluants puisque le benzamidine et la trypsine absorbaient tous les deux dans la même région spectrale. Par contre, ses résultats par électrophorèse capillaire ont été prometteurs puisqu'il était capable de séparer le benzamidine de la trypsine en utilisant la méthode de séparation des peptides à pH 2.5 avec détection UV comme l'illustre la figure 31. Les électrophérogrammes B et C sont légèrement décalés à cause de la procédure de rinçage qui n'a pas été préalablement optimisée. Ce paramètre est connu pour influencer la reproductibilité du temps de migration en électrophorèse capillaire.

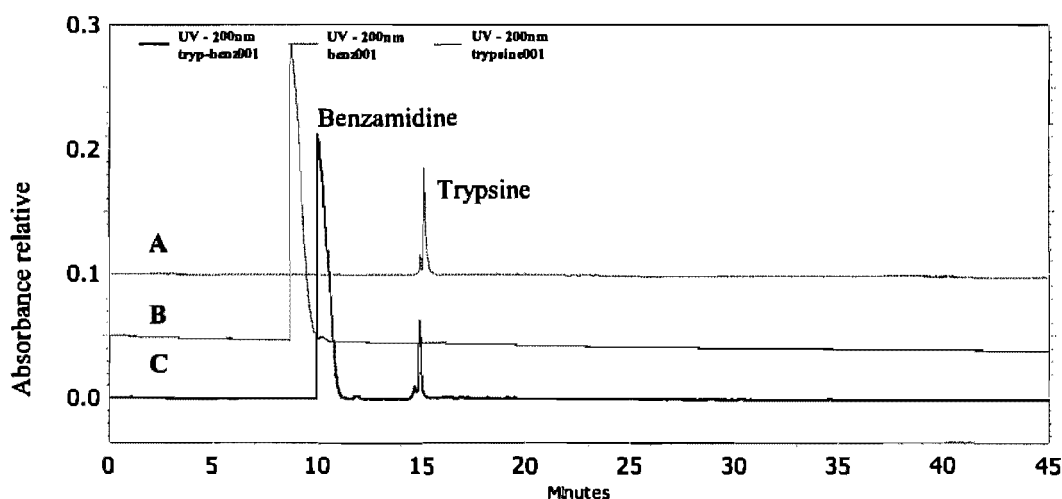


Figure 31. Électrophérogramme de la séparation du benzamidine de la trypsine dans une solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5 avec un potentiel appliqué de 15 kV[55] (A : trypsine 3 mg/mL, B : benzamidine 18.89 mg/mL et C : trypsine 3 mg/mL et benzamidine 18.89 mg/mL)

Par contre, il n'a pas été déterminé si le fait d'avoir du glutaraldéhyde aussi, présent en forte concentration dans la solution, aurait une influence sur la séparation électrophorétique de la trypsine ou du benzamidine. De plus, quelques difficultés ont été rencontrées lors de cette étude, telles que l'autolyse ou la dégradation de la trypsine à haut pH et l'asymétrie du pic de benzamidine. Il reste donc plusieurs paramètres à optimiser, tels que la solution tampon (la composition, la concentration et le pH), le « work-up » nécessaire pour éviter l'autolyse ou la dégradation des analytes, que ce soit une modification du pH ou une dilution des solutions de lavage, et les paramètres d'électrophorèse capillaire utilisés (le protocole de rinçage avant la séparation, le voltage appliqué, les conditions d'injection et la température).

4.3 Évaluation de la trypsine inhibée réticulée pour la cartographie peptidique

Afin de pouvoir déterminer si la trypsine inhibée réticulée retient une activité et donc peut être utilisée pour la cartographie peptidique, des digestions avec l'hémoglobine humaine (HbA) ont été faites. Puisque la quantification de la trypsine et du benzamidine n'ont pas pu être faites avec assez de confiance, nous avons effectué des digestions trypsiques en considérant que les réactions d'inhibition et de réticulation de trypsine ont été faites quantitativement afin de choisir la concentration appropriée en substrat. Les figures 32 et 33 montrent les cartes peptidiques obtenues après digestion avec les trypsines réticulées à pH 8.5 et 10.5 respectivement.

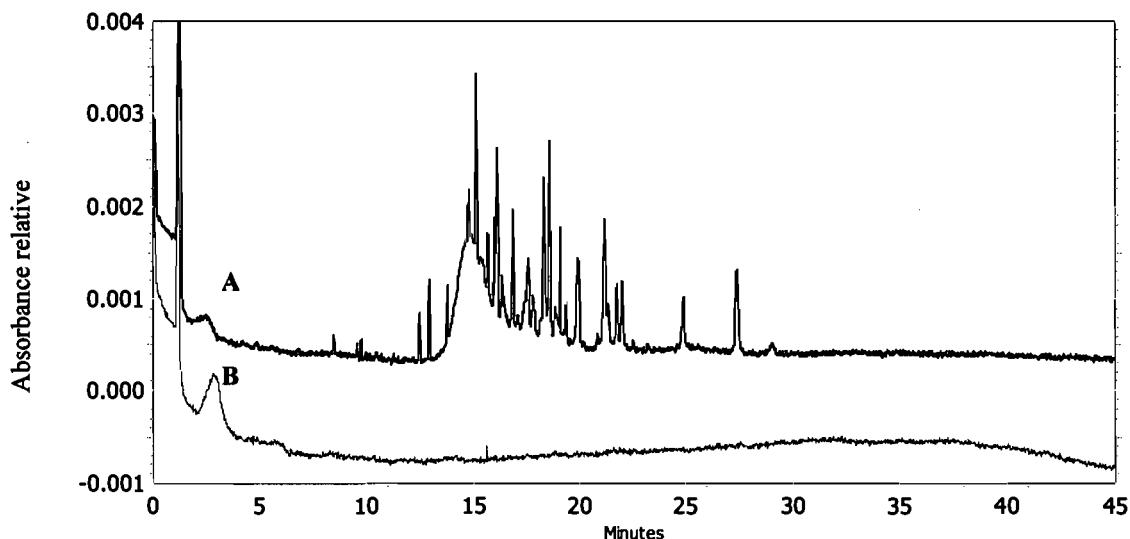


Figure 32. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée dans une solution tampon de NH_4HCO_3 50 mM pH 8.0 à 37°C pendant 4 h par la trypsine inhibée et réticulée 1:25 p/p au pH 8.5[55] (A : avec substrat, B : sans substrat), conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

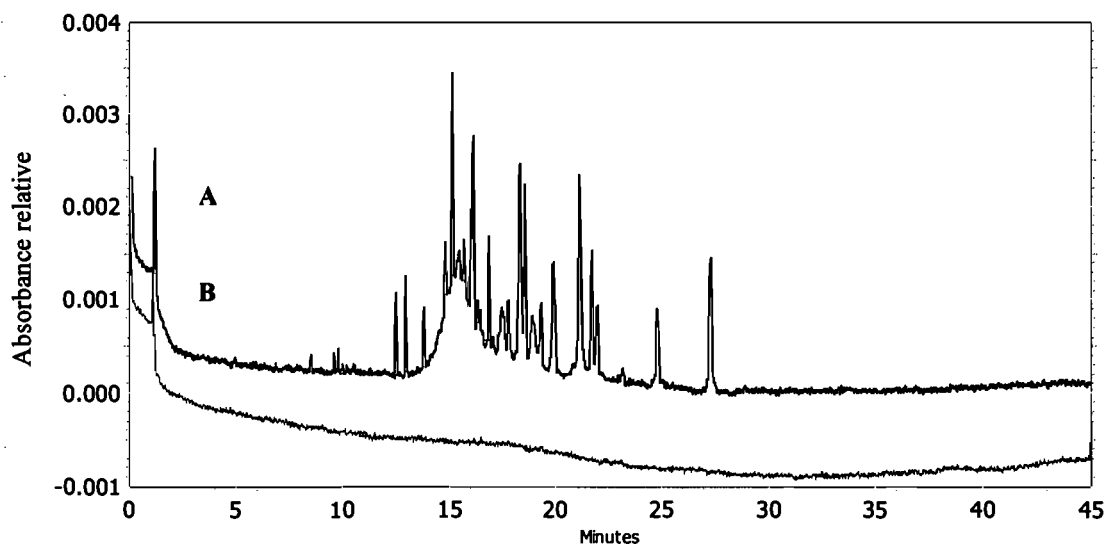


Figure 33. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée dans une solution tampon de NH_4HCO_3 50 mM pH 8.0 à 37°C pendant 4 h par la trypsine inhibée et réticulée 1:25 p/p au pH 10.5[55] (A : avec substrat, B : sans substrat), conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Comme il est possible de voir, dans les figures 32 et 33, les digestions sont relativement efficaces. Par contre, les digestions tryptiques obtenues sont quand même partielles.

Toutefois, il ne faut pas oublier que les digestions ont été faites en considérant que les rendements d'inhibition et de réticulation de trypsine soient quantitatifs et qu'il soit fort possible qu'ils ne sont pas. Aussi, il reste possiblement des études d'optimisation à compléter, quant à la solution tampon utilisée et à son pH.

Donc, en comparant ces deux derniers électrophérogrammes à celui de la digestion de l'hémoglobine humaine par la trypsine non inhibée réticulée (fig. 20 de chap. 3), il est possible de dire que les digestions ont pu être faites, dans ces deux derniers cas, sans diminuer la qualité de la digestion puisque des pics d'autolyse sont toujours absents. L'usage d'un inhibiteur réversible, tel que le benzamidine utilisé dans ces études, semble être promettant donnant le pouvoir de garder la conformation optimale de la trypsine. Un tel inhibiteur réversible devrait aussi être identifié pour la chymotrypsine. Le glutaraldéhyde, jouant un gros rôle dans la réticulation d'enzyme, doit aussi être étudié afin de bien pouvoir développer des enzymes réticulées possédant des activités catalytiques optimales. Sa quantification dans son milieu permettrait de mieux caractériser l'enzyme réticulée et d'étudier son rôle dans la distorsion de l'enzyme. Ces études seront faites dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 5

Quantification du glutaraldéhyde

Depuis le début de ces études faites par Migneault[50], le glutaraldéhyde a été utilisé comme un agent réticulant. Par contre, aucune étude a été faite pour déterminer la quantité de glutaraldéhyde non réagi avec la trypsine, qui devrait se retrouver dans les lavages, ni pour déterminer la quantité de groupements aldéhydes du glutaraldéhyde qui se retrouvent sur la trypsine réticulée et qui ont réagi avec la glycine.

La quantification du glutaraldéhyde a commencé à être importante depuis son utilisation pour la fixation des tissus végétaux et animaux pour la microscopie électronique. Plusieurs chercheurs utilisant cette méthode, notamment Fahimi[74], Anderson[75] et Frigerio et Shaw[76], ont remarqué que l'utilisation de différentes concentrations de glutaraldéhyde fait varier énormément la qualité de la fixation de tissus. En fait, c'est la détérioration du glutaraldéhyde, donc la formation de produits non voulus, tels que des acides, des semi-aldéhydes et des polymères, qui cause problème pour la fixation de tissus.

L'importance de la quantification du glutaraldéhyde lors de la réticulation des enzymes avec le glutaraldéhyde vient du fait que la quantité réticulée avec l'enzyme protéolytique peut possiblement influencer son activité catalytique. En fait, Regan *et al.* a remarqué qu'il existait une relation inverse entre l'activité et la taille des particules qui peut être reflétée par soit une distribution inégale de la protéine entre les particules de grandes et petites tailles ou une plus grande limitation diffusionnelle avec les grandes particules[58]. Chui et Wan ont déterminé que l'activité enzymatique était inversement proportionnelle à la concentration de glutaraldéhyde utilisée[59]. Selon eux, l'utilisation d'une plus grande concentration de glutaraldéhyde causerait possiblement une distorsion de la conformation du site actif et, avec cette distorsion, l'accès et l'accommodation du substrat ne sont pas aussi favorables et une décroissance de l'activité enzymatique est alors observée.

La grande difficulté avec la quantification du glutaraldéhyde est notamment cette dégradation décrite dernièrement. De plus, dans le milieu de réaction utilisé pour la réticulation d'une enzyme protéolytique avec le glutaraldéhyde, il y a d'autres produits en solution qui peuvent affecter les résultats de la détermination du glutaraldéhyde, tel que l'enzyme restante non réagi avec l'agent réticulant. Donc, une méthode requérant l'absorbance du glutaraldéhyde doit alors être éliminée à cause de la présence de

l'enzyme restante qui, elle, possède une absorbance dans la même région que le glutaraldéhyde.

5.1 Études avec le tryptophane

Lors de ces études, une tentative a été faite quant à la quantification du glutaraldéhyde utilisant le tryptophane. Cette étude a été développée sachant que le glutaraldéhyde réagit fortement avec les amines primaires et que le tryptophane est un acide aminé possédant des groupements aromatiques qui permettent alors une grande absorbance en UV. Sa quantification est alors facile même si une grande quantité de tryptophane présente en solution réagisse avec les groupements aldéhydes libres.

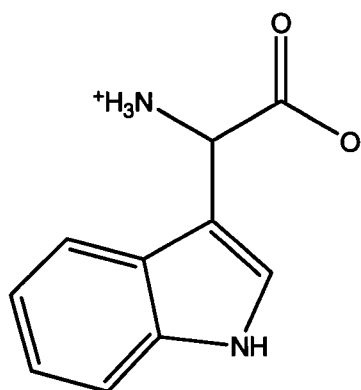


Figure 34. Structure du tryptophane à pH neutre

D'autres acides aminés aromatiques, tels que la tyrosine et la phénylalanine, auront pu être utilisés aussi mais le tryptophane a été choisi à cause de sa disponibilité au laboratoire. En fait, l'ajout du tryptophane pourrait se faire lors de deux étapes de la réticulation : 1) lors de la désactivation du glutaraldéhyde (au lieu de l'ajout de la glycine) et 2) dans les lavages.

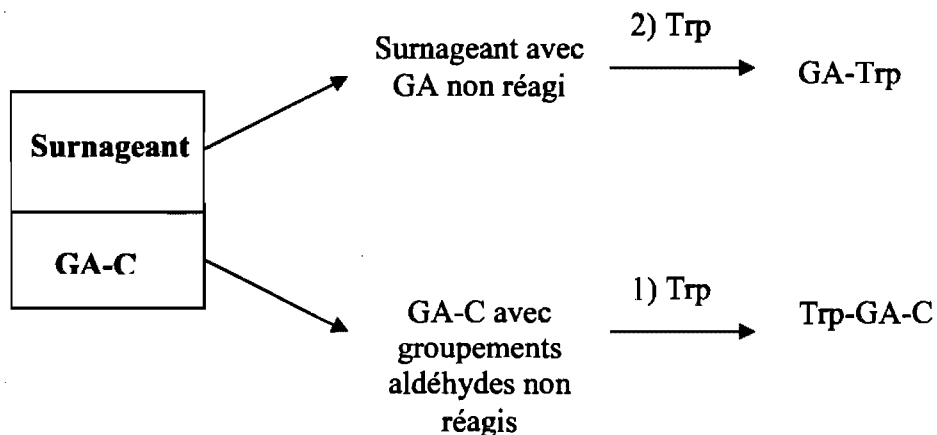


Figure 35. Schéma des réactions avec le tryptophane (Trp) pour la quantification du glutaraldéhyde (GA)

L'ajout du tryptophane (Trp) lors de ces dernières étapes permettrait alors de doser les groupements aldéhydes du glutaraldéhyde non réagis qui restent sur l'enzyme réticulée (GA-C) et du glutaraldéhyde (GA) restant dans les lavages respectivement. Par contre, cette méthode de quantification est indirecte et il faut d'abord déterminer si la réticulation du tryptophane avec le glutaraldéhyde forme un précipité et si elle est quantitative.

5.1.1 Quantification de groupements aldéhydes du glutaraldéhyde non réagis sur l'enzyme réticulée

L'analyse du tryptophane restant dans les surnageants, par électrophorèse capillaire, après l'arrêt de la réticulation par le tryptophane a permis la quantification de groupements aldéhydes non réagis sur la chymotrypsine réticulée. Un peptide, l'alanine-phénylalanine (AF), a été utilisé comme étalon interne. L'allure de l'électrophérogramme de la séparation de l'étalon interne du tryptophane est comme suit :

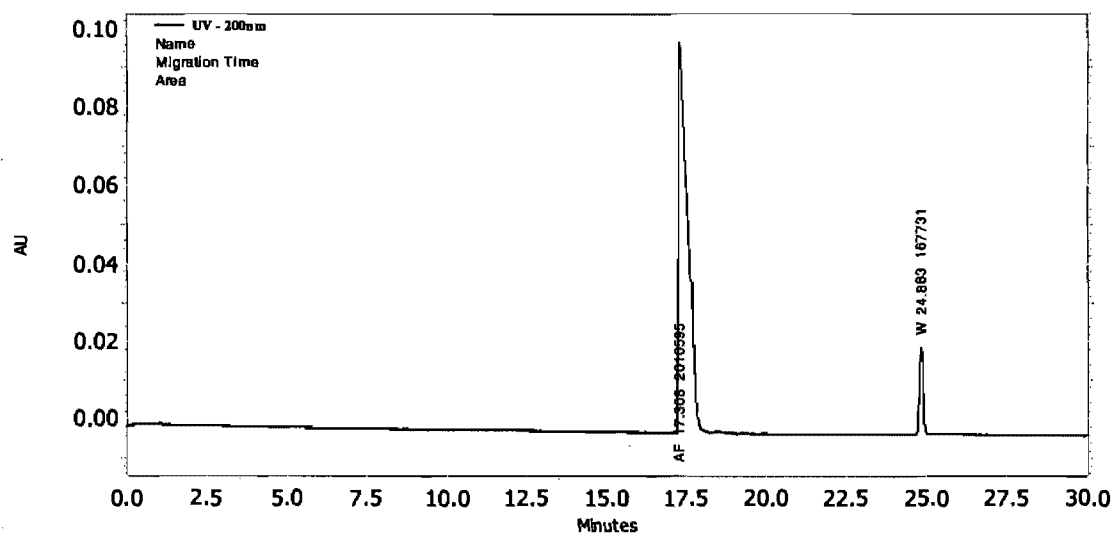


Figure 36. Électrophérogramme de la séparation de l'alanine-phénylalanine 21.5 mM du tryptophane 4.88 mM dans une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM pH 5.5, conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Une courbe d'étalonnage (fig. 35) a ensuite été effectuée utilisant un rapport des aires de pic mesurées.

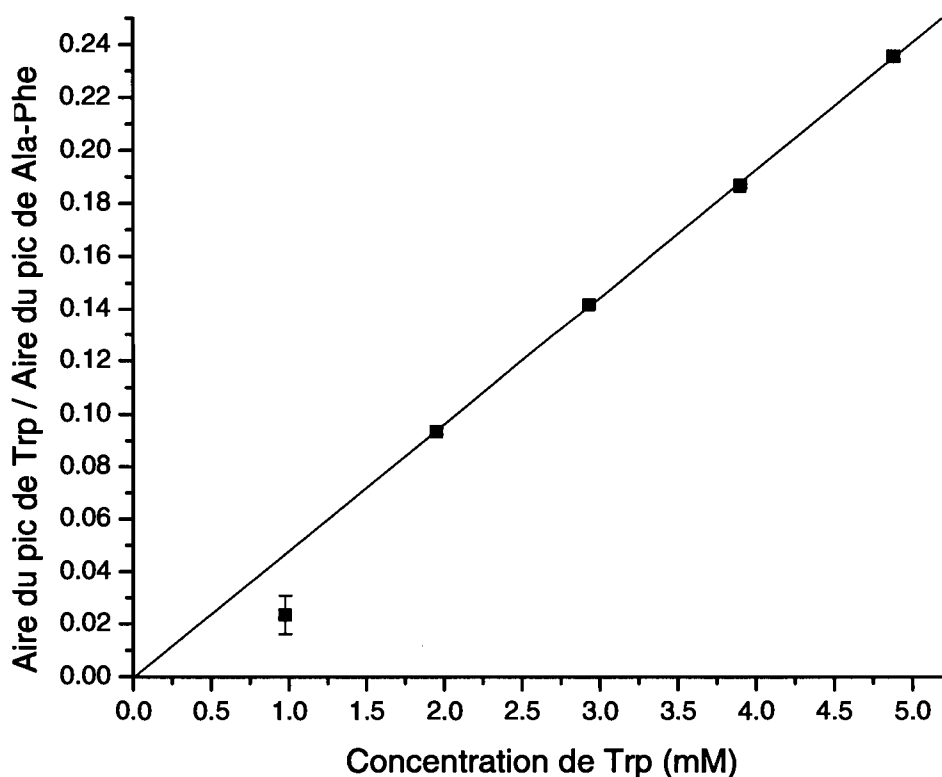


Figure 37. Courbe d'étalonnage du tryptophane dans une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM pH 5.5 ($A_W/A_{AF} = 0.0483[W] - 0.0004$)

La courbe d'étalonnage ne passe pas exactement par l'origine notamment puisque l'incertitude sur cette valeur, qui est de 0.0017, n'avait pas été tenue en compte. Le point indiquant la concentration de tryptophane à 1 mM a été omis puisque les analyses étaient moins reproductibles pour cette concentration comparativement à celles aux autres concentrations de tryptophane (2 à 5 mM). Sur cette gamme de concentration utilisée, on se situe bien dans la gamme linéaire qui sera utile pour la quantification du tryptophane. Le tableau 16 suivant montre les résultats obtenus lors de la quantification du tryptophane.

Tableau 16. Quantité de groupements aldéhydes non réagis sur la chymotrypsine réticulée

Concentration de tryptophane (mM)		Concentration de groupements aldéhydes du glutaraldéhyde (mM)	
<i>Avant</i>	<i>Après</i>	<i>Avant</i>	<i>Après</i>
12.91	4.61 ± 0.01	93.9	8.30 ± 0.01

Avant la réaction de réticulation, on retrouve 93.9 mM groupements aldéhydes en solution puisque le glutaraldéhyde, présent à une concentration de 46.9 mM, est un dialdéhyde et contient deux groupements aldéhydes. Puisqu'il ne restait que 4.61 mM de tryptophane en solution après la désactivation des groupements aldéhydes sur la chymotrypsine réticulée, il a été conclu que, après la réticulation entre la chymotrypsine et le glutaraldéhyde, il restait 8.30 mM de groupements aldéhydes (8.8% de la quantité de départ) sur l'enzyme réticulée. Il est possible de voir, par le tableau précédent, qu'il restait plusieurs groupements aldéhydes du glutaraldéhyde qui n'ont pas réagi avec la chymotrypsine et qui sont donc libres. Par contre, cette concentration ne tient pas compte de l'auto-polymérisation du glutaraldéhyde et considère que le tryptophane réagit avec le glutaraldéhyde avec un ratio molaire de 1:1. Donc, la désactivation du glutaraldéhyde avec le tryptophane a un certain avantage que celui avec la glycine. Puisque la glycine n'est pas un acide aminé aromatique, il est difficile de quantifier cette dernière afin de pouvoir déterminer la quantité de groupements aldéhydes du glutaraldéhyde restants sur la chymotrypsine réticulée. Des digestions de l'hémoglobine humaine ont été effectuées avec la chymotrypsine réticulée pour comparer l'arrêt de la réticulation avec la glycine versus avec le tryptophane afin de voir si l'utilisation du tryptophane modifie l'activité de l'enzyme réticulée. Les cartes peptidiques suivantes ont été obtenues (fig. 36).

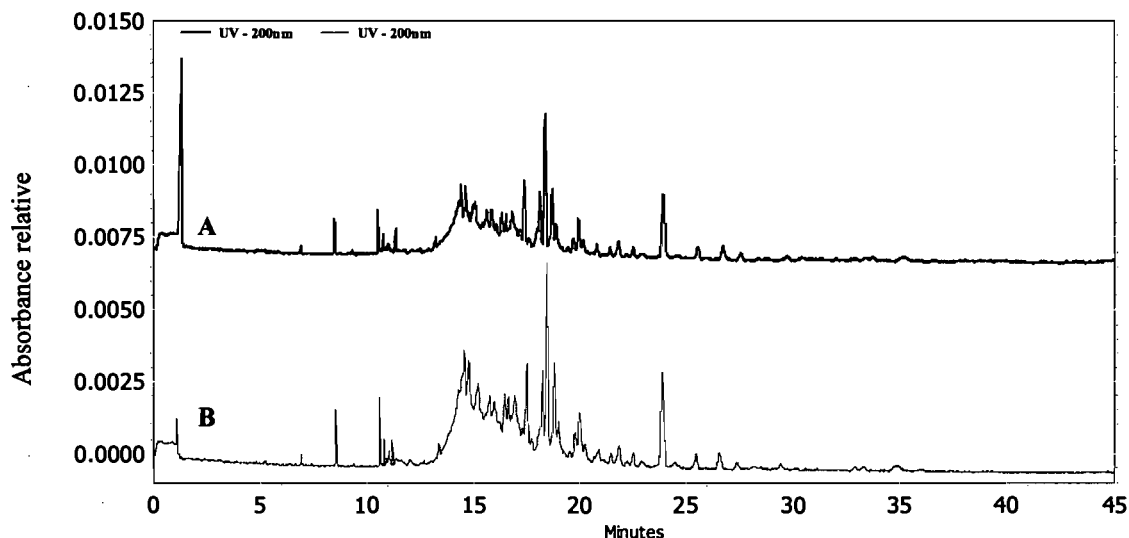


Figure 38. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine réticulée 1:25 p/p dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 37°C pendant 4 h. A : arrêt de la réticulation par la glycine; B : arrêt de la réticulation par le tryptophane, conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Il est possible de voir par le dernier électrophérogramme (fig. 36) que les deux digestions obtenues, celle avec l'arrêt de la réticulation par le tryptophane et celle avec la glycine, sont très similaires, donc l'utilisation de l'un ou l'autre acide aminé donne des résultats comparables. Par contre, l'ajout du tryptophane sur la chymotrypsine réticulée attirerait possiblement encore plus les acides aminés aromatiques envers le site actif possédant déjà une forte affinité pour ces derniers et l'utilisation du tryptophane permet possiblement de faciliter la quantification du glutaraldéhyde.

5.1.2 Quantification du glutaraldéhyde restant dans les lavages

Afin de doser la quantité de glutaraldéhyde non réagi avec la chymotrypsine, le tryptophane a été ajouté au surnageant récupéré pour former un précipité lourd et brun observé qui serait possiblement le tryptophane précipité après sa réaction avec le glutaraldéhyde. En fait, l'efficacité de la quantification se base sur la supposition que le glutaraldéhyde réagit totalement avec le tryptophane qui est ajouté. Des analyses électrophorétiques ont été effectuées, de la même manière que pour quantifier les

groupements aldéhydes du glutaraldéhyde restants non réagis sur l'enzyme réticulée, afin d'obtenir les résultats suivants.

Tableau 17. Quantité de glutaraldéhyde restant dans les lavages

Concentration de tryptophane (mM)		Concentration de glutaraldéhyde (mM)	
<i>Avant</i>	<i>Après</i>	<i>Avant</i>	<i>Après</i>
12.21	3.0 ± 0.4	46.9	9.2 ± 0.4

Il est possible de voir que 80.4% du glutaraldéhyde ajouté lors du début de la réticulation a réagi avec la chymotrypsine puisque, au départ, on avait 46.9 mM de glutaraldéhyde et on ne retrouve que 9.19 mM qui ait réagi avec le tryptophane. Par contre, cette réaction ne tient pas compte de la polymérisation du glutaraldéhyde avec lui-même et considère que le glutaraldéhyde réagit avec le tryptophane avec un rapport molaire de 1:1. Il se peut très bien que, puisque le glutaraldéhyde possède deux groupements réactifs qu'un mole du glutaraldéhyde ait réagi avec deux moles de tryptophane.

Enfin, cette approche avec le tryptophane permet une certaine estimation de la quantité de glutaraldéhyde qui a réagi avec la chymotrypsine et permet donc d'avoir une idée de l'étendue de la réticulation. Il faut, désormais, effectuer plus d'études sur cette approche pour assurer que la réticulation qui se fait entre le tryptophane et le glutaraldéhyde soit quantitative par un ajout d'excès plus élevé de tryptophane par exemple. Lors des études préliminaires faites, il était difficile de dissoudre le tryptophane dans le milieu voulu. Il aurait fallu diluer le glutaraldéhyde afin de pouvoir ajouter l'excès de tryptophane désiré. De plus, il faudrait faire réagir des concentrations connues de tryptophane et de glutaraldéhyde en utilisant différents rapports molaires jusqu'à l'épuisement du glutaraldéhyde de départ ajouté pour vérifier qu'il ait bien une réaction quantitative qui se fait.

En fait, une autre manière d'avoir une idée de l'étendue de la réticulation serait d'utiliser l'analyse des acides aminés pour déterminer le nombre de lysines non réagis sur l'enzyme comme Lee *et al.*[64] ont fait pour caractériser la réticulation de la collagénase

et de la trypsine avec le glutaraldéhyde. Par contre, selon eux, la décroissance de lysines disponibles après la réticulation est une indication de l'étendue de la réaction mais pas nécessairement de l'étendue de la réticulation puisque l'auto-polymérisation du glutaraldéhyde se fait aussi.

Il existe quelques méthodes de quantification de glutaraldéhyde qui ne sont pas encore, à ce jour, appliquées à la méthode de réticulation d'enzyme utilisée. Par exemple, Anderson exploite l'efficacité de la réaction des aldéhydes avec l'hydroxylamine formant des aldoximes (présumablement via la déshydroxylation du groupement carbonyle) afin de quantifier le glutaraldéhyde[75]. Par contre, le titrage de l'hydroxylamine requiert l'utilisation de l'indicateur bromophénol bleu qui est souvent utilisé comme agent colorant pour les protéines lors de l'électrophorèse sur gel[77, 78]. Donc, ayant l'enzyme non réticulée en faible concentration dans les lavages, l'utilisation de cette dernière méthode donnerait des résultats légèrement faussés à cause de l'interaction ionique formée entre l'indicateur et la protéine. Frigerio et Shaw ont développé une méthode simple pour la détermination du glutaraldéhyde en ajoutant, dans un premier temps, un excès connu de bisulfite suivi d'un titrage du bisulfite non réagi par une solution standard de I_3^- en présence d'un indicateur d'amidon[76]. L'utilisation serait possible puisque le titrage se fait dans une solution tampon phosphate à pH 6.85, ce qui est très similaire aux pH utilisés pour la réticulation des enzymes. De plus, cette méthode n'est pas affectée par la présence de phosphate, des solutions tampons de phosphate-sucrose ou cacodylate, ni par la présence des acides glutariques. Pranaitytė *et al.* ont aussi utilisé l'interaction glutaraldéhyde-bisulfite afin de déterminer le glutaraldéhyde dans les développeurs photographiques par électrophorèse capillaire en utilisant une couche polymérique cationique, le poly(chlorure de diallyldiméthylammonium)[79]. Cette dernière méthode requiert une étape supplémentaire de dérivatisation du capillaire avant d'entreprendre la quantification du glutaraldéhyde. Par contre, l'analyse se fait à pH 6.0 qui est assez proche des milieux de réticulation utilisés.

En résumé, les deux dernières méthodes n'ont pas encore été appliquées pour la méthode de réticulation utilisée qui laisse des petites traces d'enzymes en solution. Donc, la vérification de ses effets serait essentielle lors du développement d'un essai efficace

pour quantifier le glutaraldéhyde dans les surnageants et lavages. Les études plus poussées faites sur le glutaraldéhyde pourraient améliorer le développement des enzymes réticulées et des microréacteurs qui se servent de ces dernières. Le chapitre 6 suivant montre les études faites afin de développer des microréacteurs hors lignes et en lignes avec CE en utilisant la chymotrypsine réticulée.

CHAPITRE 6

Développement des microréacteurs

L'aspect mécanique pour faire fonctionner un microréacteur est assez complexe. Plusieurs obstacles peuvent survenir, tels que des blocages dans les capillaires, des solutions tampons différents utilisés pour la réaction enzymatique et pour la séparation ainsi que des problèmes de détection. Des études préliminaires ont d'abord été faites en utilisant un montage hors ligne afin d'éviter plusieurs complications reliés au montage en ligne.

6.1 Microréacteur hors ligne

6.1.1 Avec frits

Dans un premier temps, l'utilisation d'un microréacteur muni de frits pour éviter la perte d'enzyme réticulée et muni d'un capillaire de transfert a été utilisé. Le montage utilisé a été inspiré de Bonneil[17]. Par contre, des méthodes *in-situ* (voir sections 2.3.6 et 2.3.7 du chapitre 2) ont été employées lors des essais détaillés dans ce mémoire puisque l'ajout de l'enzyme préalablement réticulée au capillaire était problématique causant souvent des problèmes de blocage. Aussi, la réaction de réticulation a été laissée pendant la nuit, notamment, puisque le capillaire ne semblait pas être « rempli » par la chymotrypsine réticulée après deux heures de réticulation. Cet effet peut être dû au fait que le milieu de réaction est beaucoup plus restreint que dans un tube Eppendorf de 2.0 mL. De plus, la réticulation, cette fois-ci, est faite dans un milieu beaucoup plus concentré (pour tous les réactifs) qu'habituellement en solution en gardant les proportions relatives d'enzyme et de glutaraldéhyde égales. Donc, l'augmentation du temps de réticulation donne l'impression d'avoir une plus grande quantité d'enzyme réticulée dans le microréacteur.

Les premières digestions effectuées dans ce microréacteur ont été faites en laissant la solution de HbA 2 mg/mL réagir pendant différentes périodes de temps. L'analyse de la solution d'entreposage (eau) indique que la chymotrypsine réticulée est restée intacte et qu'il n'y a pas eu de perte d'enzyme durant l'entreposage. Tout d'abord, des injections fluidiques ont été faites où les temps de résidence de la protéine dénaturée ne sont que de quelques secondes. La solution de protéine dénaturée a été injectée à 20 psi donnant alors une carte peptidique avec l'allure suivante (fig. 39).

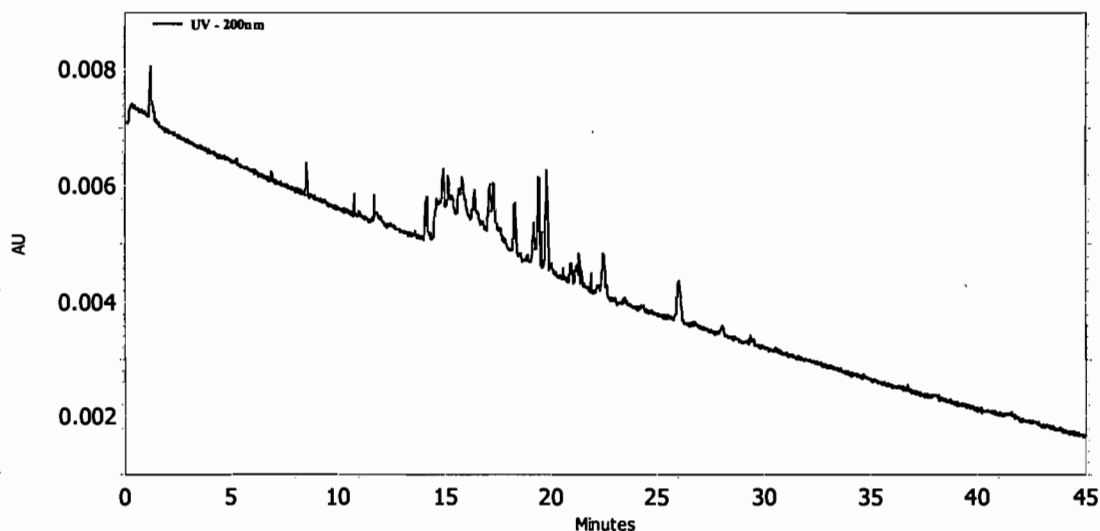


Figure 39. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine réticulée dans le microréacteur dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm. Écoulement à 20 psi d'Ar appliqué donnant une période de digestion de <10 s.

Remarquant alors que la digestion chymotrypsique a été incomplète dans ce dernier cas, une pression moins élevée a été utilisée pour l'injection de la protéine dénaturée dans le microréacteur afin de permettre un temps de résidence plus élevé de la protéine. Une digestion de l'hémoglobine humaine à 5 psi donne alors une carte peptidique ayant l'allure suivante.

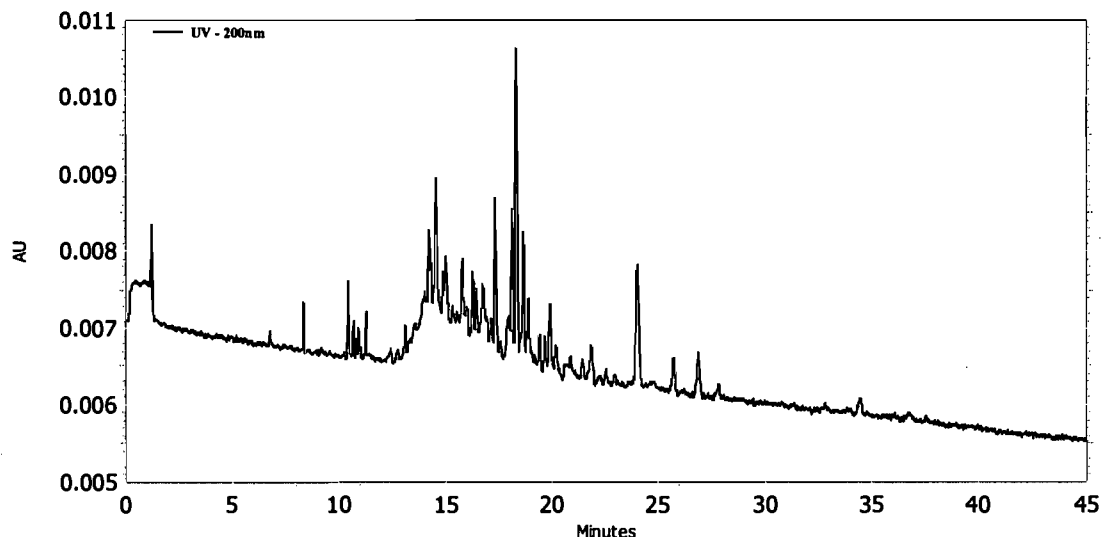


Figure 40. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine réticulée dans le microréacteur dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm. Écoulement à 5 psi d'Ar appliqué.

Par le nombre de pics indiquant des peptides obtenus et par l'allure de la carte peptidique, il est possible de dire que la digestion chymotrypsique dans ce dernier cas est comparable à celle faite avec une pression de 20 psi. Il faut noter que dans les trois cas précédents, lors d'une diminution de la pression d'argon appliqué, le temps de résidence du substrat avec l'enzyme est plus élevé permettant la digestion d'une plus grande quantité de substrat à la fois. Le jugement des qualités des cartes peptidiques est souvent subjectif. Par contre, il est possible de dire que la limite de détection de l'instrument se situe autour de 1 μM pour un peptide et l'utilisation d'une concentration d'hémoglobine humaine de 2 mg/mL, donc 30 μM , permettrait facilement l'observation des peptides obtenus par sa digestion. Enfin, une dernière digestion avec ce microréacteur a été faite pendant 24 h avant son blocage complet.

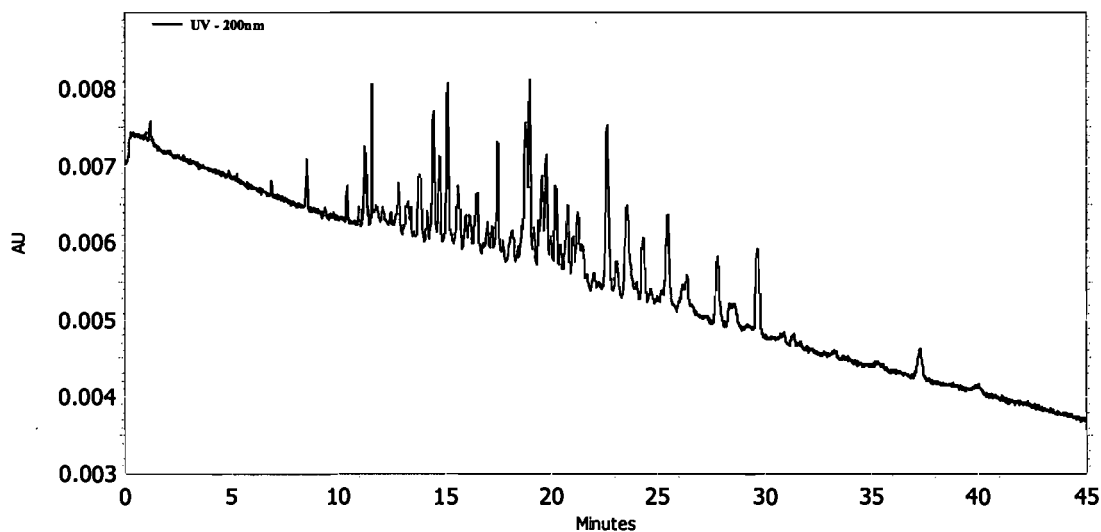


Figure 41. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine réticulée dans le microréacteur dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C pendant 24 h sans écoulement; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

En fait, plusieurs remarques ont été faites avec cette première tentative pour la fabrication d'un microréacteur. D'abord, les solutions obtenues de protéine digérée semblent être incolores et transparentes, ce qui n'est pas l'allure habituelle des solutions de protéine digérée en solution. Habituellement, les solutions obtenues sont généralement rougeâtres. Cet effet peut être dû au fait que le fer, provenant de l'hémoglobine humaine (le substrat) utilisée, se dépose sur les parois du capillaire, possiblement attiré par les silanols[80]. De plus, le blocage serait possiblement dû au fait que, avec le temps et l'utilisation du microréacteur, la chymotrypsine réticulée, qui n'est aucunement attachée aux parois du capillaire, se déplace vers la sortie du microréacteur bloquant alors le frit et donc l'accès au capillaire de transfert. Afin d'éliminer ce problème de blocage, où il y aurait une accumulation de chymotrypsine réticulée empaquetée au bout du microréacteur, il a été décidé de tenter de trouver un moyen afin d'immobiliser la chymotrypsine réticulée sur les parois du capillaire du microréacteur. La prochaine partie de ce chapitre montrera ces études faites à cet effet.

6.1.2 Immobilisation à l'aide de la silanisation

Plusieurs techniques *in-situ* peuvent être employées pour l'immobilisation des enzymes au capillaire, notamment par la technologie de biotine-avidine[29], par la formation de couches électrostatiques[25-27] et par la formation de liens covalents[23, 28]. La silanisation serait un moyen de créer des liens covalents avec les parois internes du microréacteur en utilisant toujours l'enzyme réticulée avec le glutaraldéhyde développée lors de ces études.

La silanisation est le traitement d'une surface inorganique à base de SiO_2 ayant des groupements hydroxyles afin de créer des liens $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$. L'aminosilanisation est une technique souvent utilisée pour l'immobilisation d'enzymes sur les particules à base de gel de silice[81]. Dans le cas de ce projet, cette technique rendrait les groupements amines disponibles sur la surface de la silice du microréacteur lors de l'ajout d'un aminoalkoxysilane pour permettre l'enzyme réticulée avec le glutaraldéhyde de s'immobiliser (s'attacher) sur les parois du capillaire grâce à ses groupements aldéhydes libres. Pour plus de 20 ans, les alkoxysilanes ont été utilisés dans un contexte industriel comme agent coupleur pour le glaçage et la teinture d'une variété de matériels[82] et donc sa réactivité a été bien étudiée.

En fait, le 3-aminopropyltriéthoxysilane (3-APTS), un mono-aminosilane, a déjà souvent été utilisé pour diverses méthodes d'immobilisation d'enzymes sur un support. Voivodov *et al.*[81] ont utilisé cette technique pour immobiliser la pepsine sur du gel de silice. Un dérivé de l'isothiocyanate a été utilisé comme agent de couplage au lieu du glutaraldéhyde qui serait utilisé dans le cas de ce projet.

Plusieurs études d'immobilisation d'enzyme utilisent le glutaraldéhyde comme agent de couplage. Afin de démontrer l'efficacité de cette méthode d'immobilisation avec le glutaraldéhyde, Blasi *et al.*[83] ont fait la comparaison entre l'immobilisation nécessitant trois étapes (l'incubation avec le 3-APTS et, ensuite, le glutaraldéhyde avant l'ajout de l'enzyme) et celle utilisant quatre étapes, (l'incubation avec le 3-APTS, le traitement avec le triéthylamine et l'anhydride succinique et, ensuite, l'activation avec le chlorure thionylique avant l'ajout de l'enzyme) pour l'immobilisation du glutamate déshydrogénase (GDH) sur des supports de silicium afin de l'utiliser lors de formation des biocapteurs. La première procédure suscite la réaction avec des groupements amines

primaires de la protéine par la formation de bases de Schiff, tandis que la deuxième procédure suscite la réaction avec les groupements amines primaires et les groupements sulphidriques de la protéine. Torabi *et al.*[56] ont démontré l'efficacité de la méthode d'immobilisation décrite pour la co-immobilisation du cholestérol oxydase et du raifort peroxidase sur du perlite, un support inorganique contenant 70% de silice. Leurs résultats ont démontré que la procédure utilisant le 3-APTS et le glutaraldéhyde était plus efficace pour l'immobilisation d'enzyme notamment dû au fait que les groupements amines permettent l'immobilisation de l'enzyme sur les supports de silice sans désactiver la protéine.

De plus, plusieurs aminosilanes peuvent être utilisés. Metwalli *et al.*[84] ont comparé l'utilisation des mono-, di- et tri-aminosilanes (fig. 42) pour le traitement des surfaces de verre, pour l'immobilisation d'ADN. Ils ont utilisé plusieurs techniques pour la caractérisation des surfaces, notamment la spectroscopie photoélectronique X-ray (XPS) pour mesurer semi-quantitativement l'épaisseur de la couche de silane sur les surfaces de verres, la spectroscopie Raman, la microscopie de force atomique (AFM) et le potentiel zeta.

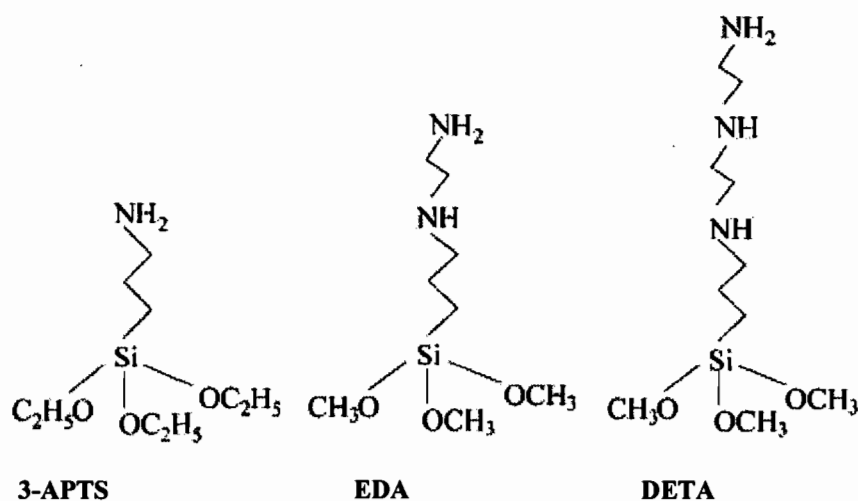


Figure 42. Structures de 3-aminopropyltriéthoxysilane (3-APTS), N-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyltriméthoxysilane (EDA) et (3-triméthoxysilylpropyl) diéthylènetriamine (DETA)[84]

Leurs résultats ont démontré que le DETA, un tri-aminosilane, offre aussi des avantages pour l'immobilisation d'ADN à cause de son potentiel zeta plus élevé que le 3-APTS et à

cause de son plus grand contenu de surface en azote. Par contre, sa taille moléculaire est plus élevée et les résultats obtenus par AFM ont démontré que le 3-APTS offre une surface plus lisse par rapport à la surface rugueuse que donne le DETA. Ces derniers résultats peuvent aussi être appliqués pour justifier l'utilisation des aminosilanes pour l'immobilisation des protéines.

L'utilisation des surfaces de silice poreuses contrairement à des surfaces de silices non poreuses s'est avérée plus utile selon les études de Singh *et al.*[85] pour l'immobilisation de l'acétylcholinestérase et de l'organophosphate hydrolase sur des supports de silice. En fait, leurs études ont démontré que les supports poreux non seulement donnaient un meilleur rendement d'immobilisation d'enzyme et une plus grande activité enzymatique, mais amélioraient aussi la stabilité enzymatique à long terme de l'enzyme immobilisée. Ferreira *et al.*[86] ont utilisé l'aminosilanisation pour l'immobilisation et la stabilisation de la protéase *Bacillus licheniformis* sur différents supports de silice. Les différents supports de silice utilisés, dans ce dernier cas, contenaient de la silice de tailles différentes et activés soit par le 3-APTS ou par le 3-TESPM (le 3-(triméthoxysilyl)propylméthacrylate). Ils ont remarqué alors que la silice activée par le 3-APTS avait un moins grand pourcentage de protéine immobilisée mais présentait une plus grande activité spécifique et totale. De plus, la silice, ayant des pores plus grosses, présentait de plus grandes activités spécifiques relatives que celle ayant des pores plus petites. Kim *et al.*[87], quant à eux, ont utilisé la silice nanoporeuse afin d'immobiliser le glutaryl-7-ACA acylase, une enzyme utilisée pour le processus de bioconversion pour la synthèse d'un antibiotique, via le 3-APTS et le glutaraldéhyde, et l'activité enzymatique a été étudiée en relation avec la morphologie poreuse. Ils ont aussi remarqué que l'activité enzymatique était meilleure, à cause d'une plus grande quantité d'enzyme immobilisée, lorsque la taille des pores était plus élevée jusqu'à l'obtention d'un certain plateau (diamètre de 60.9 nm). Par contre, lorsque la taille de pores était plus élevée que 69.3 nm, l'enzyme immobilisée se séparait de la silice durant le processus de bioconversion. En fait, cette méthode d'immobilisation a même été utilisée par Ettalibi et Baratti[88] afin d'immobiliser les inulinases extraites de *Aspergillus ficinum* sur des billes de verres poreuses pour l'hydrolyse du sucrose. Contrairement à l'immobilisation avec la silice, une plus petite taille de pores des billes (diamètre de 80 Å), donnant une plus grande aire

spécifique ($400 \text{ m}^2/\text{g}$), permettait d'avoir une plus grande quantité d'enzyme immobilisée, donc une plus grande activité enzymatique, lors de l'immobilisation sur des billes de verres poreuses.

Comme il est possible de voir, plusieurs auteurs ont utilisé la méthode de silanisation avec du 3-APTS suivi de l'activation par le glutaraldéhyde, comme agent de couplage, pour l'immobilisation d'enzyme sur des supports de silice. Par contre, à ce jour, aucune méthode n'a été trouvée utilisant la silanisation pour l'immobilisation d'enzyme dans un capillaire de silice fondue. En fait, plusieurs études dans le passé démontrent l'immobilisation des enzymes sur des surfaces et sur des parois internes des capillaires sans utiliser la silanisation[23, 25-28, 43]. Pour les études décrites dans ce mémoire, on voudrait immobiliser (ou ancrer) l'enzyme réticulée sur les parois internes des capillaires utilisant la silanisation et non simplement immobiliser l'enzyme. Les premières études faites démontrent cette immobilisation simple de l'enzyme sur les parois internes du capillaire et les études faites par la suite démontrent l'utilisation de la même méthode pour l'immobilisation de l'enzyme réticulée sur les parois internes du capillaire. Pour ce faire, la méthode d'immobilisation de Torabi *et al.*[56] a été utilisée pour la silanisation des parois internes d'un capillaire de silice fondue afin d'immobiliser (*i.e.* de retenir) la chymotrypsine réticulée. La réaction de silanisation ainsi que de l'immobilisation de l'enzyme sont schématisées dans la figure 43.

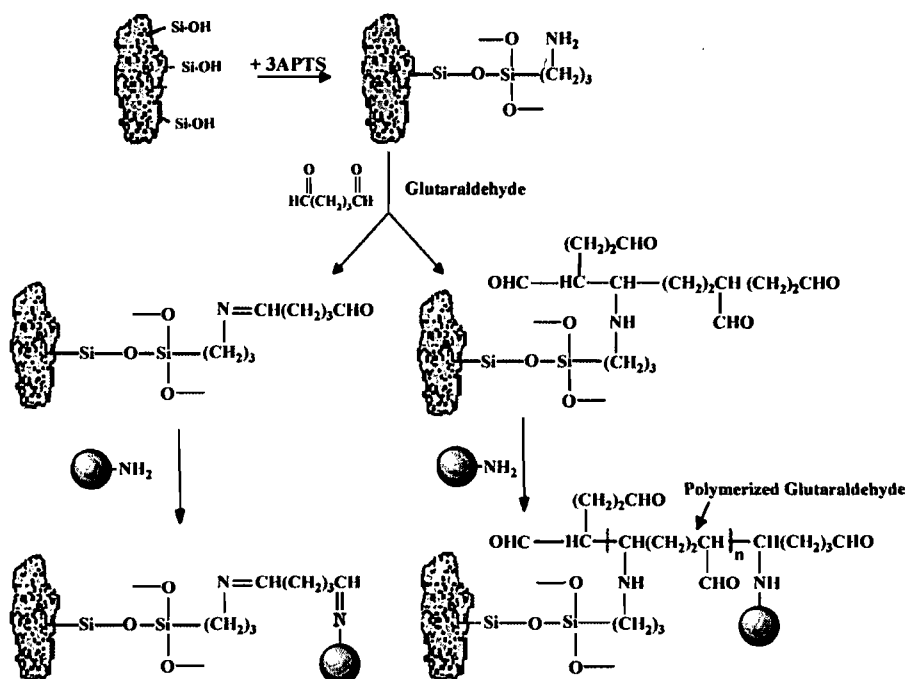


Figure 43. Deux mécanismes possibles de l'immobilisation d'une protéine par le glutaraldéhyde et le 3-APTS[56]

Le volume occupé par la taille de la chymotrypsine immobilisée dans le microréacteur dépendrait du fait que le glutaraldéhyde soit polymérisé ou non et, si oui, de son degré de polymérisation. Afin de déterminer les meilleures conditions pour l'immobilisation de la chymotrypsine dans un microréacteur, cinq combinaisons des conditions suivantes (tableau 18) dans cinq capillaires différents (tableau 19), microréacteurs 1 à 5, ont d'abord été testées.

Tableau 18. Différentes conditions examinées pour l'immobilisation de la chymotrypsine aux parois du capillaire de silice fondue ($L_t = 20$ cm, d.i. = 530 μ m)

Étape 1 Silanisation avec le 3-APTS	Étape 2 Ajout du glutaraldéhyde	Étape 3 Ajout de la chymotrypsine
1a : 3-APTS 10% (v/v) dans tampon acétate 50 mM pH 4.0 à 75°C pendant 4h	2a : GA 10% (v/v) dans l'eau à 22°C pendant 2h	3a : chymotrypsine 0.67 mM dans tampon acétate 50 mM pH 5.5 à 22°C pendant 2h
1b : 3-APTS 50% (v/v) dans tampon acétate 50 mM pH 4.0 à 75°C pendant 4h	2b : GA 50% (v/v) dans l'eau à 22°C pendant 2h	3b : chymotrypsine 1.3 mM dans tampon acétate 50 mM pH 5.5 à 22°C pendant 2h
		3c : chymotrypsine 0.67 mM dans tampon acétate 50 mM pH 5.5 à 4°C pendant 2h
	2c : GA 10% (v/v) et chymotrypsine 0.67 mM dans tampon acétate 50 mM pH 5.5 à 4°C pendant 2 h	
	2d : GA 10% (v/v) dans l'eau à 4°C pendant 2 h	3d : chymotrypsine 0.67 mM dans tampon acétate 50 mM pH 5.5 à 4°C pendant 2 h sans lavage avant

Tableau 19. Microréacteurs avec combinaisons de conditions utilisées

Microréacteur	Conditions (selon tableau précédent)
1	1a, 2a, 3a
2	1a, 2b, 3a
3	1a, 2a, 3b
4	1b, 2b, 3b
5	1a, 2a, 3c
6	1a, 2c
7	1a, 2a, 3d
8	1a, 2d, 3d

Les digestions de l'hémoglobine humaine ont été effectuées en faisant passer la protéine dénaturée à une pression externe d'environ 2 psi (appliquée au réservoir de la solution substrat) ce qui équivaut à un temps de résidence de moins que 10 secondes, les cartes

peptidiques montrées dans la figure 44 ont été obtenues. Les injections ont toutes été faites la même journée.

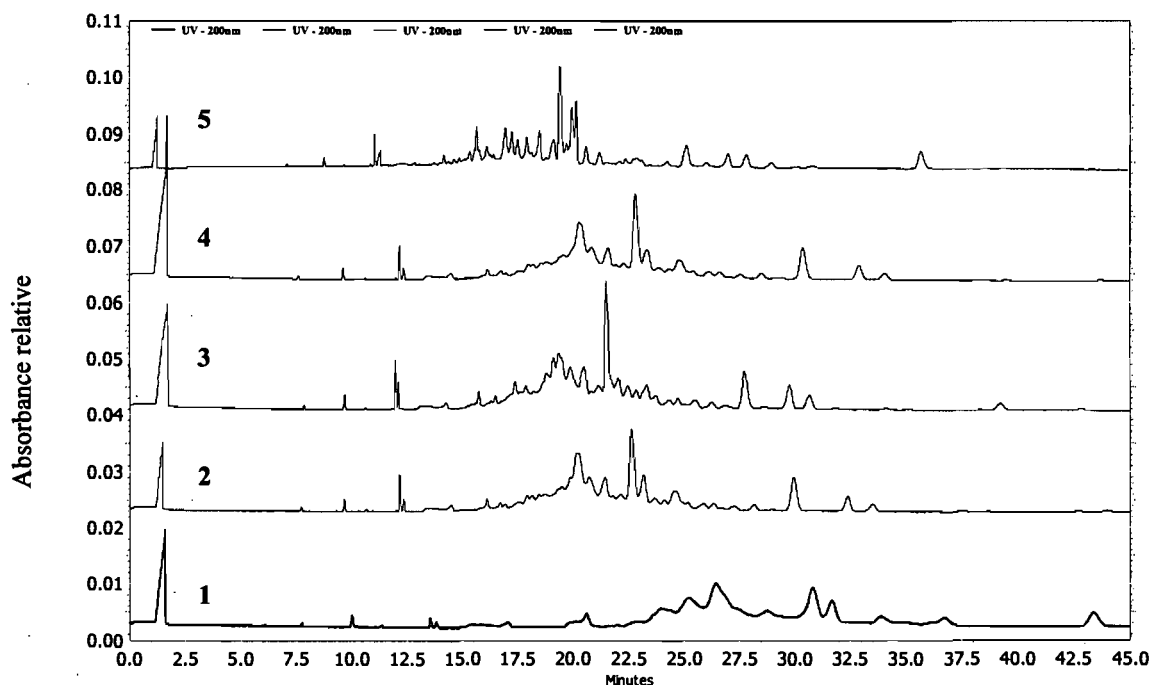


Figure 44. Cartes peptidiques de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine immobilisée dans les microréacteurs 1-5 dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C à 2 psi; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Par l'intensité des pics peptidiques ainsi que par la résolution des pics, dans les traces 1 à 5 à la figure 44, les conditions utilisées pour le microréacteur 5 semblent être les plus efficaces pour cette méthode d'immobilisation. Des digestions de 24 h ont aussi été faites pour les autres microréacteurs (1-4) pour tenter d'améliorer la carte peptidique. Les résultats donnés dans la figure 45 démontrent que, les cartes peptidiques, dans chacun des cas, ont été améliorées en ayant un temps de résidence plus élevé. De plus, cette figure démontre la réutilisabilité de ces microréacteurs.

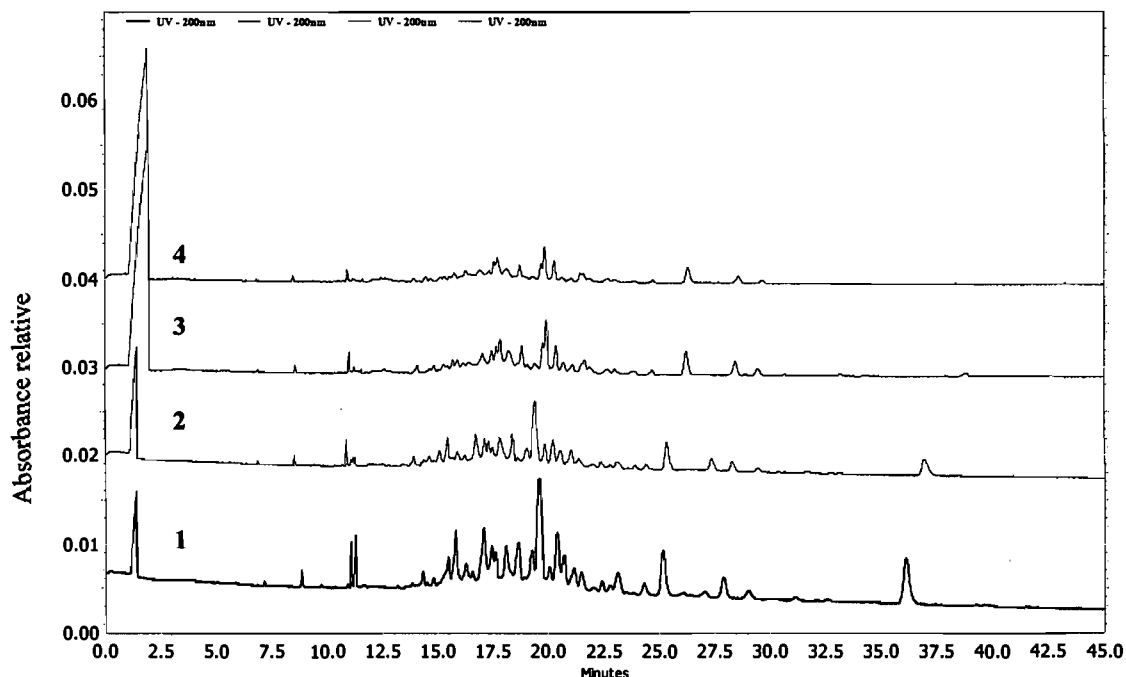


Figure 45. Cartes peptidiques de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine immobilisée dans les microréacteurs 1-4 dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C pendant 24 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Ensuite, une méthode d'immobilisation de la chymotrypsine réticulée a aussi été développée pour voir si cette méthode serait aussi efficace. La méthode de Torabi *et al.*[56] utilisée précédemment pour l'immobilisation de la chymotrypsine a été donc légèrement modifiée. En n'effectuant aucun lavage après la réaction du glutaraldéhyde pendant 2 h sur la surface de silice modifiée par le 3-APTS, il serait possible d'obtenir, théoriquement, la réticulation d'enzyme dans les capillaires. Aussi, en mélangeant la chymotrypsine et le glutaraldéhyde avant son injection simultanée dans les capillaires permettrait d'avoir une enzyme réticulée et non simplement immobilisée sur les parois du capillaire. Les conditions données dans le tableau 18 ont été utilisées dans trois capillaires différents du tableau 19 (microréacteurs 6 à 8). Des digestions d'hémoglobine humaine ont été faites pendant 4 et 24 h dans chacun des microréacteurs afin de donner les cartes peptidiques observées dans les figures 46 et 47 respectivement.

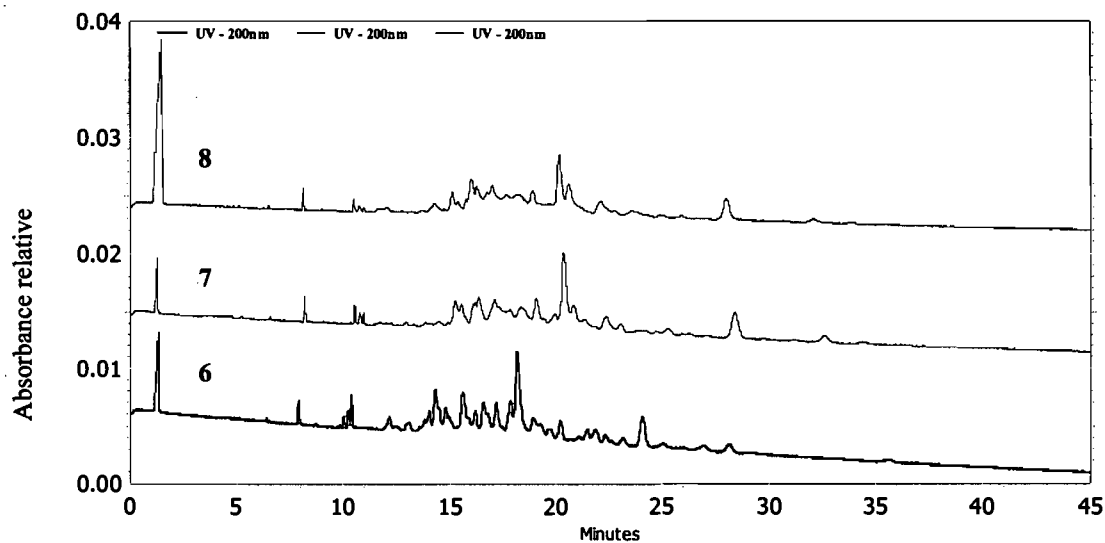


Figure 46. Cartes peptidiques de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine immobilisée dans les microréacteurs 1-3 dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C pendant 4 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

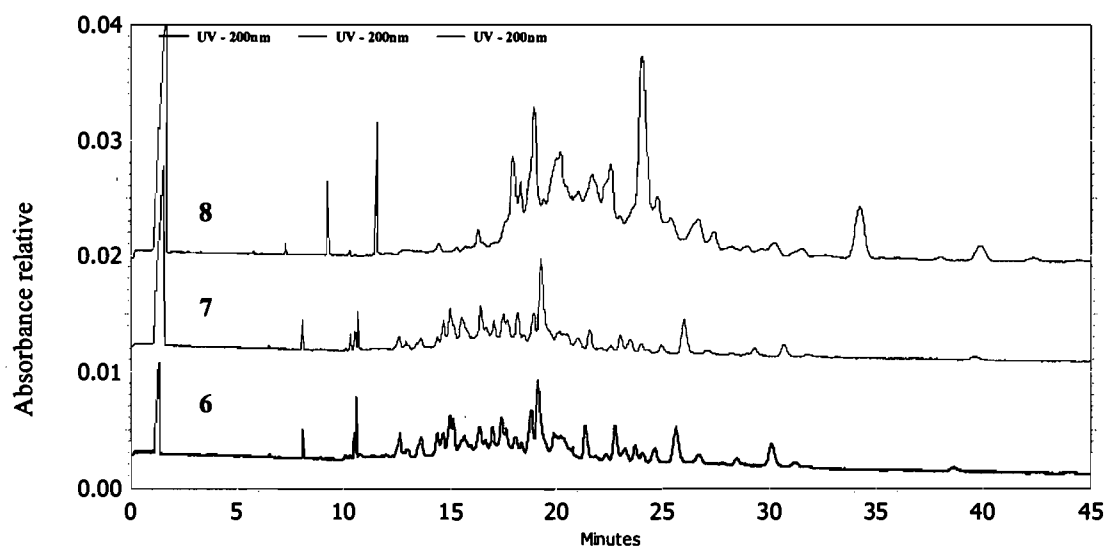


Figure 47. Cartes peptidiques de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine immobilisée dans les microréacteurs 1-3 dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 22°C pendant 24 h; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Comme il est possible de voir, par les électrophérogrammes des digestions de 4 h (fig. 46), les conditions utilisées pour le microréacteur 6 ont été les plus efficaces pour l'immobilisation de la chymotrypsine réticulée sur les parois du capillaire de silice fondue. En augmentant le temps de résidence de la protéine dénaturée dans les

microréacteurs jusqu'à 24 h, les cartes peptidiques se sont améliorées par le nombre de peptides (pics) observés et par l'intensité des pics qui est plus importante. Donc, ces dernières conditions seraient celles qui seront utilisées lors des essais pour le microréacteur en ligne.

En fait, plusieurs difficultés ont été rencontrées lors de l'immobilisation de la chymotrypsine et lors de l'immobilisation de la chymotrypsine réticulée sur les parois du capillaire. Notamment, dans ces cas-ci, les microréacteurs peuvent aussi se boucher. Le produit réticulé est visiblement un matériau mou qui peut se compacter considérablement lorsqu'un liquide poussé par une pression essaye de passer à travers ce dernier. Cet effet semble être plutôt aléatoire mais peut aussi être dû aux différentes concentrations de réactifs utilisées. Lors de ces études, à part des cartes peptidiques de HbA produits, aucune autre étude de caractérisation de la chymotrypsine immobilisée n'a été faite. Ces dernières études ont simplement été utilisées afin de tenter de fabriquer un microréacteur en ligne en utilisant les meilleures conditions obtenues à ce jour.

6.2 Microréacteur en ligne

Jusqu'à ce moment, les digestions protéolytiques ont été faites soit en solution ou en utilisant des microréacteurs hors lignes, où les peptides sont récoltés dans des petits tubes, suivies des analyses par électrophorèse capillaire qui sont faites à part après. Le but ultime serait d'avoir un système de cartographie peptidique où le substrat est introduit et la carte peptidique est produite en ligne en minimisant la manipulation d'échantillon. Une telle méthode en ligne aura, entre autres, l'avantage de diminuer les pertes d'échantillon lors des transferts. Pour le microréacteur en ligne, il a été décidé d'utiliser une cartouche CE de Beckman-Coulter contenant un capillaire de diamètre interne de 250 μm pour le microréacteur et une autre cartouche contenant un capillaire de diamètre interne de 50 μm pour la séparation des peptides. L'utilisation d'un plus gros diamètre interne pour le microréacteur est essentielle afin de diminuer des blocages causés par l'enzyme réticulée immobilisée. Les conditions optimales pour le microréacteur hors ligne 1 ont été utilisées pour immobiliser la chymotrypsine réticulée aux parois du capillaire. Par contre, la température utilisée pour la silanisation a dû être modifiée puisque la température maximale permise pour le système d'électrophorèse capillaire est

de 60°C. Donc, le 3-APTS a été laissé réagir à pH 4.0 pendant 5 h à 60°C et, ensuite, le glutaraldéhyde 10% (v/v) et la chymotrypsine 0.67 mM ont été ajoutés à pH 5.5 pendant 2 h à 4°C (voir la section 2.3.7.1).

Lors de la première digestion d'hémoglobine humaine, une pression de 50 psi pendant une minute a été utilisée pour introduire le substrat dans le microréacteur capillaire. La carte peptidique issue est montrée à la figure 48.

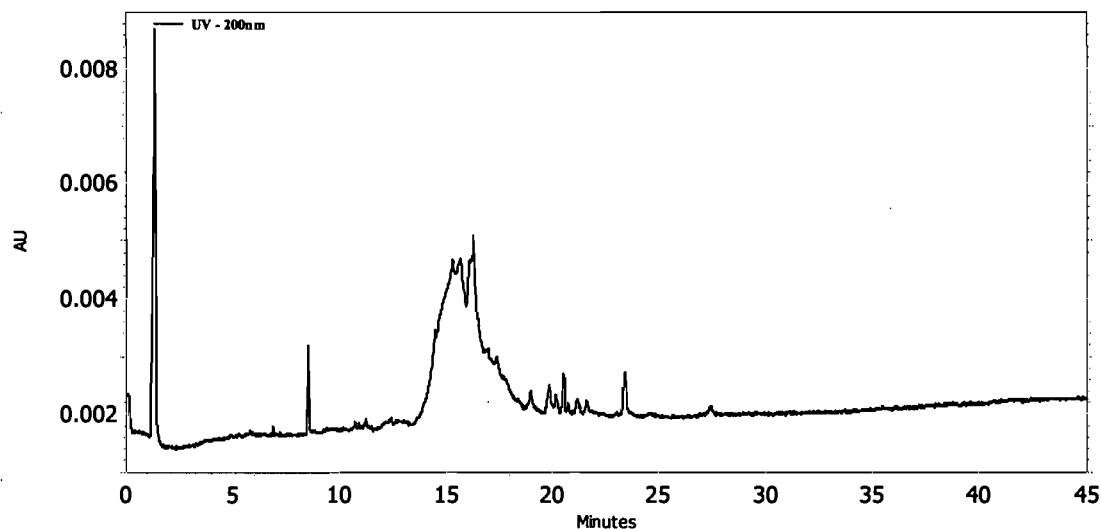


Figure 48. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine réticulée et immobilisée dans le microréacteur en ligne dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 à 50 psi pendant 1 minute à 25°C; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

La carte peptidique de la figure 48 montre clairement que la digestion est incomplète. Le gros pic à 16 min montre le substrat non digéré. Celle-ci serait probablement due au temps de résidence peu élevé couplé à une activité enzymatique assez faible. En essayant d'effectuer des lavages après la digestion, le capillaire s'est bouché et il n'était plus possible de faire d'autres digestions avec le même microréacteur.

Un autre a donc été fabriqué en utilisant les mêmes dimensions et les mêmes conditions que ce dernier. Par contre, pour éviter des blocages, cette fois-ci, la réaction dans le capillaire se fait simplement en « rinçant » le capillaire à une pression de 15.0 psi avec les solutions contenant les réactifs avant de laisser le temps de réaction nécessaire à

la température voulue. Une digestion de 4 h du substrat HbA a alors été faite. Les résultats sont affichés à la figure 49.

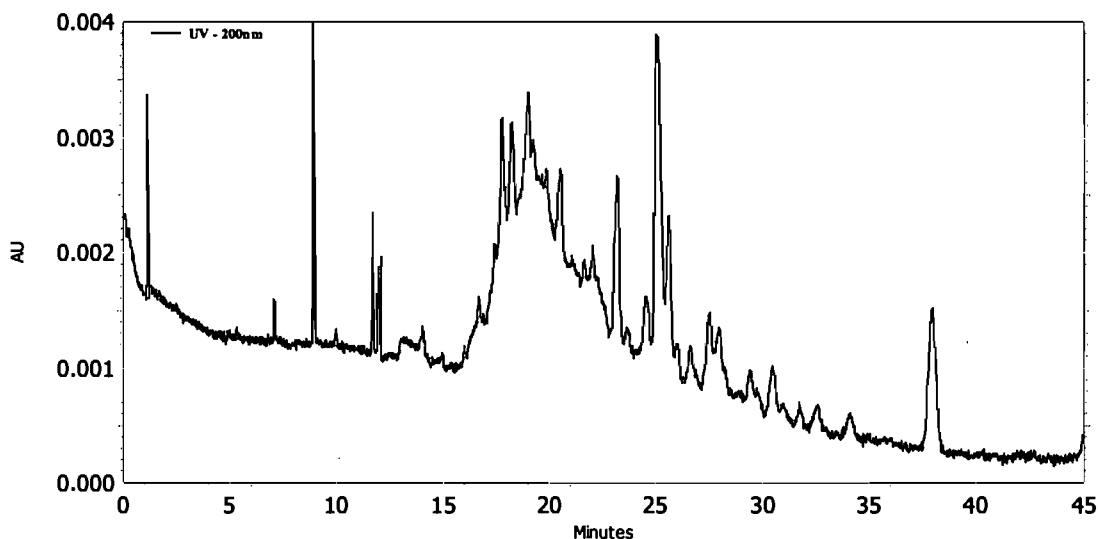


Figure 49. Carte peptidique de HbA dénaturée 2 mg/mL digérée par la chymotrypsine immobilisée dans le microréacteur en ligne dans une solution tampon de Tris-HCl 0.1 M avec CaCl_2 0.01 M pH 7.8 pendant 4 h à 25°C; conditions de séparation : solution tampon de NaH_2PO_4 50 mM pH 2.5, $V_{\text{app}} = 15$ kV, $L_t = 60$ cm et $L_d = 50$ cm

Il est possible de voir (fig. 49), dans ce cas-ci, que la digestion de l'hémoglobine humaine est plus avancée que la précédente. Par contre, la digestion chymotrypsique n'est toujours pas complète comme indiqué par le pic large vers 18 min ce qui est le HbA dénaturé avec les peptides chymotrypsiques superposés sur ce dernier. De plus, lors du développement du microréacteur en ligne, un capillaire de diamètre interne de 530 μm (d.e. = 800 μm) n'a pas pu être utilisé puisque la cartouche Beckman n'a seulement été conçue pour l'utilisation des capillaires ayant des diamètres externes jusqu'à 400 μm . Ce dernier fait affecte sûrement la réaction de silanisation et d'immobilisation d'enzyme à l'intérieur du capillaire puisque le volume est plus petit laissant moins de liquide passer lorsque les parois sont recouvertes d'enzyme réticulée immobilisée et donc améliorant la probabilité de blocage du microréacteur.

Donc, pour les études faites à ce jour pour le microréacteur en ligne faite par aminosilanisation, il est possible de conclure que la réaction de silanisation ainsi que d'immobilisation permettent d'immobiliser la chymotrypsine réticulée aux parois du

capillaire. Par contre, il faudrait jouer avec les conditions, donc les quantités et les concentrations, les rapports molaires pour les réactifs, la température et la durée des réactions, afin de réduire le problème de blocage et d'améliorer les digestions enzymatiques. Il faudrait aussi faire des expériences de contrôle pour vérifier l'utilité de la silanisation par le 3-APTS, donc préparer un capillaire selon les meilleures conditions en absence du 3-APTS lors de la première étape. Théoriquement, cette dernière réaction devrait immobiliser l'enzyme réticulée pour éviter sa mobilité dans le capillaire et donc permettrait la réutilisation du microréacteur.

Quelques études peuvent aussi être faites afin de caractériser l'enzyme immobilisée se trouvant à l'intérieur du capillaire afin de pouvoir améliorer son efficacité et son activité. Par exemple, la méthode décrite par Greenberg[89] permettrait de déterminer les groupements hydroxyles sur la silice. Voivodov *et al.*[81] ont décrit une méthode pour la détermination des groupements amines sur leur gel de silice. Park *et al.*[10], de leur côté, ont traité le glutaraldéhyde avant son utilisation pour l'immobilisation du GL-7-ACA acylase sur le gel de silice afin d'améliorer son activité en diminuant les réactions adverses du glutaraldéhyde. En fait, selon eux, en traitant le glutaraldéhyde avant au pH 8.5 à 60°C pendant 50 min, l'activité enzymatique augmente de 60% lorsqu'elle est comparée à celle sans traitement du glutaraldéhyde. L'utilisation des petits substrats, tels que le TAME pour la trypsine et le BTEE pour la chymotrypsine, peuvent alors être utilisées pour déterminer l'activité enzymatique du microréacteur utilisé. Donc, ces dernières étapes mentionnées peuvent être utilisées pour améliorer la méthode pour l'immobilisation de l'enzyme réticulée en mieux caractérisant l'enzyme.

CHAPITRE 7

Conclusions et travaux futurs

La cartographie peptidique est un outil bioanalytique important pouvant être servie afin de comparer rapidement deux échantillons d'une protéine dans l'espoir de signaler des modifications post-translationnelles ou des anomalies reliés à la chaîne peptidique, et ce, par électrophorèse capillaire, par chromatographie liquide ou par spectrométrie de masse. L'électrophorèse capillaire est préférée puisqu'elle permet la détection de tous les pics peptidiques grâce à sa haute résolution comparativement à la spectrométrie de masse qui ne permet le recouvrement qu'une fraction des fragments peptidiques selon sa capacité de s'ioniser. De plus, l'usage des enzymes libres en solution peut créer des pics d'autolyse non voulus et non reproductibles rendant la carte peptidique difficile à interpréter. L'usage des enzymes immobilisées permet de résoudre les effets indésirables des enzymes libres. Plusieurs méthodes permettant la réticulation des enzymes protéolytiques avec le glutaraldéhyde ont été développées afin d'obtenir des enzymes plus stables, réutilisables et ne créant peu ou pas de pics d'autolyse lors de la cartographie peptidique, sans mentionner qu'elles peuvent être utilisées en plus grande quantité et en format microréacteur.

Le présent travail de recherche avait pour but d'appliquer les travaux précédents faits par quelques anciens membres du groupe en développant une méthode pour la réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde tout en caractérisant ce type d'enzyme et en utilisant ces dernières enzymes pour développer un microréacteur en ligne pour la cartographie peptidique.

Tout d'abord, le projet de recherche détaillé dans ce mémoire a permis de décrire une méthode développée pour la réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde tout en caractérisant les enzymes (la trypsine et la chymotrypsine) réticulées avec le glutaraldéhyde, tels que décrits au Chapitre 3. Des études des conditions de réticulation ont été faites afin d'évaluer le pH de réticulation optimal, déterminé par le rendement, le rapport molaire de glutaraldéhyde:chymotrypsine optimal, déterminé par le temps nécessaire pour observer un précipité et par le rendement, et le moyen pour inactiver le glutaraldéhyde. L'utilisation d'une solution tampon d'acétate 50 mM au pH 5.5 avec un rapport molaire de glutaraldéhyde:chymotrypsine de 375:1 a permis une réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde presque quantitative selon la limite de détection par spectroscopie d'absorption de dérivée. La caractérisation des enzymes réticulées

avec le glutaraldéhyde, la trypsine et la chymotrypsine, a aussi été détaillée. L'activité spécifique de la trypsine réticulée était de 4.01 U TAME/mg de trypsine, tandis que celle de la chymotrypsine réticulée était de 1.5 U BTEE/mg de chymotrypsine. Ces derniers résultats concordent avec la littérature qui confirme que l'activité enzymatique diminue lors la réticulation ou l'immobilisation d'une enzyme[9, 11, 12, 61]. La taille des particules de la trypsine et la chymotrypsine réticulée étaient très similaires donnant, toutes les deux, des tailles moyennes de $(12.0 \pm 0.6) \mu\text{m}$. Les cartes peptidiques obtenues par électrophorèse capillaire et par spectrométrie de masse, soit par MALDI-TOF, ont permis de conclure que les enzymes réticulées avec le glutaraldéhyde peuvent produire des digestions efficaces du substrat employé (le HbA), sans créer de pics d'autolyse, et reproductibles même en augmentant la quantité d'enzyme réticulée.

Des études préliminaires ont été faites afin de tenter d'améliorer l'activité spécifique de la trypsine réticulée par l'utilisation de son inhibiteur réversible, le benzamidine, pendant la réaction de réticulation. Ces dernières études ont été effectuées avec Denis Santiagos, stagiaire d'été. Le pH optimal de la réticulation en présence de l'inhibiteur a été déterminé, donc de 10.7, et ce, par l'observation du précipité (sa présence et son volume). Les études faites pour quantifier le benzamidine et la trypsine ont permis de conclure que l'électrophorèse capillaire pourrait être utilisée pour ces fins en améliorant quelques paramètres de séparation. La trypsine inhibée réticulée a même été utilisée pour la digestion de l'hémoglobine humaine pour la cartographie peptidique par électrophorèse capillaire démontrant sa possibilité d'utilisation éventuelle pour ces fins.

Le Chapitre 5 décrit les études faites pour la quantification du glutaraldéhyde, et ce, pour les groupements aldéhydes non réagis sur l'enzyme réticulée et pour le glutaraldéhyde restant dans les lavages. Ces quantifications ont été faites en utilisant l'ajout d'une quantité connue de tryptophane au départ et en la comparant avec la quantité de tryptophane restante suivant sa réaction avec le glutaraldéhyde. Des essais par électrophorèse capillaire ont été faits pour quantifier le tryptophane non réagi. Ces résultats ont montré que 80.4% du glutaraldéhyde, avec 9.2 mM de glutaraldéhyde restant comparativement à sa concentration de départ de 46.9 mM, a réagi avec la chymotrypsine mais 8.8% des groupements aldéhydes du glutaraldéhyde sont libres. Par contre, la

réaction de tryptophane avec le glutaraldéhyde a été présumée être quantitative mais il faudrait vérifier si elle est belle et bien quantitative. Quelques autres méthodes de quantification de glutaraldéhyde ont aussi été proposées et détaillées lors de ce chapitre.

Utilisant les conditions optimales de réticulation de la chymotrypsine, un microréacteur hors ligne a d'abord été utilisé pour la fabrication du microréacteur en ligne. L'utilisation des frits pour retenir la chymotrypsine réticulée s'est avérée inefficace créant des blocages fréquents qui sont survenus avec plusieurs usages du microréacteur. L'aminosilanisation des parois internes du microréacteur par le 3-APTS a alors été utilisée pour immobiliser la chymotrypsine réticulée aux parois du capillaire servant comme microréacteur. L'optimisation de cette méthode a été faite montrant alors que l'aminosilanisation faite par le 3-APTS 10% v/v dans une tampon acétate 50 mM à pH 4.0 à 75°C pendant 4 h suivie par la réticulation de la chymotrypsine 0.67 mM et le glutaraldéhyde 10% v/v dans une tampon acétate 50 mM à pH 5.5 à 4°C pendant 2 h sont les méthodes les plus efficaces pour l'immobilisation de l'enzyme réticulée. Ceci a été conclu en jugeant simplement la qualité de la carte peptidique de l'hémoglobine humaine obtenue par électrophorèse capillaire. Lors de l'utilisation de ces conditions en ligne, par contre, plusieurs problèmes se sont survenus, notamment le blocage du capillaire. La température de silanisation a aussi été modifiée puisqu'elle est limitée par le système d'électrophorèse capillaire. Néanmoins, les études faites en ligne ont permis de conclure que la réaction d'immobilisation de la chymotrypsine réticulée permettrait de produire une enzyme active parce que des cartes peptidiques ont été obtenues. Il serait, par contre, idéal de modifier quelques paramètres des réactions de silanisation et de réticulation afin de mieux convenir au système fluide utilisé.

Enfin, les objectifs de départ, donc le développement d'une méthode pour la réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde et la fabrication d'un microréacteur en ligne, ont été atteints même s'il reste des améliorations à faire au microréacteur en ligne. Remarquant alors que l'activité enzymatique des enzymes réticulées est inférieure à celle des enzymes libres, il serait idéal, dans la mesure du possible, de tenter d'améliorer son activité, soit avec l'usage de leur inhibiteur ou par une autre méthode, telle que l'usage d'un autre acide aminé pour la désactivation du glutaraldéhyde. La taille des particules d'enzyme réticulée semble aussi avoir une

influence sur l'activité catalytique de l'enzyme et des futures études faites sur ce sujet pourraient aussi améliorer la qualité des enzymes réticulées. De plus, la découverte d'un essai fiable pour quantifier le glutaraldéhyde adaptée à la méthode de réticulation permettrait alors de déterminer la masse d'enzyme réticulée utilisée pour les digestions enzymatiques. Il faudrait possiblement songer à utiliser la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) pour suivre la réaction de polymérisation du glutaraldéhyde. Pour ce qui est des études sur les microréacteurs en ligne, il faudrait changer quelques conditions de silanisation et d'immobilisation afin de les adapter au système d'électrophorèse capillaire pour produire rapidement des cartes peptidiques reproductibles en minimisant la probabilité de blocage du microréacteur utilisé. La méthode utilisée pour la cartographie peptidique en ligne étant optimisée, des études sur les limites de détection seraient la suite logique, et ce, pour la limite de détection instrumentale et sur la méthode elle-même. Il serait aussi intéressant de tenter la réticulation d'une autre enzyme protéolytique disponible, par exemple le GluC ou l'AspN, selon la méthode utilisée pour la trypsine et la chymotrypsine. Ces enzymes possèdent, eux aussi, une certaine spécificité et donc sont utilisées pour la cartographie peptidique. Les méthodes de silanisation et d'immobilisation décrites dans ce mémoire peuvent aussi être utilisées pour d'autres enzymes en format microréacteur en ligne. L'usage d'un microréacteur en ligne donnerait des cartes peptidiques reproductibles sans pics d'autolyse et l'immobilisation d'enzyme permettrait une plus grande stabilité d'enzyme sans mentionner le fait qu'elle serait réutilisable. Ce dernier point est le plus important pour les enzymes qui coûtent très chères telles que le GluC et l'AspN.

CHAPITRE 8

Références

1. Garrett, R.H. and C.M. Grisham. *Biochemistry*. 1998 [cited; Available from: <http://web.virginia.edu/Heidi/chapter16/chp16frameset.htm>].
2. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemistry*. 3rd ed. 2004, États-Unis: John Wiley & Sons Inc. 1591.
3. Ross, G.A., P. Lorkin, and D. Perrett, *Separation and tryptic digest mapping of normal and variant haemoglobins by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1993. **636**: p. 69-79.
4. Wheat, T.E., P.M. Young, and N.E. Astephen, *Use of Capillary Electrophoresis for the Detection of Single-Residue Substitutions in Peptide Mapping*. Journal of Liquid Chromatography, 1991. **14**: p. 987-996.
5. Ingram, V.M., *Abnormal Human Haemoglobins. I. The Comparison of Normal Human and Sickle-Cell Haemoglobins by "Fingerprinting"*. Biochimica et Biophysica Acta, 1958. **28**: p. 539-545.
6. Ingram, V.M., *Abnormal Human Haemoglobins. III. The Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Haemoglobins*. Biochimica et Biophysica Acta, 1959. **36**: p. 402-411.
7. Altun, G.D. and S.A. Cetinus, *Immobilization of pepsin on chitosan beads*. Food Chemistry, 2007. **100**(3): p. 964-971.
8. Huckel, M., H.-J. Wirth, and M.T.W. Hearn, *Porous zirconia: a new support material for enzyme immobilization*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1996. **31**(3-4): p. 165-179.
9. Geng, L., N. Li, M. Xiang, X. Wen, D. Xu, F. Zhao, and K. Li, *The covalent immobilization of trypsin at the galleries of layered [gamma]-zirconium phosphate*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. **30**(1-2): p. 99-109.
10. Park, S.W., Y.I. Kim, K.H. Chung, S.I. Hong, and S.W. Kim, *Covalent immobilization of GL-7-ACA acylase on silica gel through silanization*. Reactive and Functional Polymers, 2002. **51**(2-3): p. 79-92.
11. Habeeb, A.F.S.A., *Preparation of Enzymically Active, Water-Insoluble Derivatives of Trypsin*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1967. **119**: p. 264-268.
12. Jansen, E.F., Y. Tomimatsu, and A.C. Olson, *Cross-linking of α -Chymotrypsin and Other Proteins by Reaction with Glutaraldehyde*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1971. **144**: p. 394-400.
13. Rajput, Y.S. and M.N. Gupta, *Coaggregate of Trypsin and Chymotrypsin*. Biotechnology and Bioengineering, 1988. **31**: p. 220-223.
14. Betancor, L., F. Lopez-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G.D.-O.C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, and J.M. Guisan, *Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **39**(4): p. 877-882.
15. Migneault, I., C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, and K.C. Waldron, *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. Biotechniques, 2004. **37**(5): p. 790-802.
16. Porter, D.H., H.E. Swaisgood, and G.L. Catignani, *Characterization of an immobilized digestive enzyme system for determination of protein digestibility*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1984. **32**(2): p. 334-339.

17. Bonneil, E., M. Mercier, and K.C. Waldron, *Reproducibility of a solid-phase trypsin microreactor for peptide mapping by capillary electrophoresis*. *Analytica Chimica Acta*, 2000. **404**(1): p. 29-45.
18. Hu, J., S. Li, and B. Liu, *Properties of immobilized pepsin on Modified PMMA microspheres*. *Biotechnology Journal*, 2006. **1**: p. 79-79.
19. Sachin P. Shukla, S.D., *Immobilization of pepsin on an acrylamide/2-hydroxyethyl methacrylate copolymer and its use in casein hydrolysis*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2005. **96**(5): p. 1544-1549.
20. Díaz, J.F. and K.J. Balkus, *Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1996. **2**(2-3): p. 115-126.
21. Broun, G.B., *Chemically Aggregated Enzymes*. *Methods in Enzymology*, 1976. **XLIV**: p. 263-280.
22. Migneault, I., C. Dartiguenave, J. Vinh, M.J. Bertrand, and K.C. Waldron, *Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(9): p. 1367-1378.
23. Simonet, B.M., A. Rios, and M. Valcarcel, *Analytical potential of enzyme-coated capillary reactors in capillary zone electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2004. **25**: p. 50-56.
24. Strausbauch, M.A., J.P. Landers, and P.J. Wettstein, *Mechanism of Peptide Separations by Solid Phase Extraction Capillary Electrophoresis at Low pH*. *Analytical Chemistry*, 1996. **68**(2): p. 306-314.
25. Tang, Z. and J. Kang, *Enzyme Inhibitor Screening by Capillary Electrophoresis with and on-Column Immobilized Enzyme Microreactor Created by an Ionic Binding Technique*. *Anal. Chem.*, 2006. **78**: p. 2514-2520.
26. Tang, Z., T. Wang, and J. Kang, *Immobilized capillary enzyme reactor based on layer-by-layer assembling acetylcholinesterase for inhibitor screening by CE*. *Electrophoresis*, 2007. **28**: p. 2981-2987.
27. Hooper, S.E. and M.R. Anderson, *Modification of a Capillary for Electrophoresis by Electrostatic Self-Assembly of an Enzyme for Selective Determination of the Enzyme Substrate*. *Electroanalysis*, 2007. **19**: p. 652-658.
28. Bossi, A., L. Guizzardi, M.R. D'Acunto, and P.G. Righetti, *Controlled enzyme-immobilisation on capillaries for microreactors for peptide mapping*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004. **378**: p. 1722-1728.
29. Licklider, L. and W.G. Kuhr, *Optimization of On-Line Peptide Mapping by Capillary Zone Electrophoresis*. *Anal. Chem.*, 1994. **66**: p. 4400-4407.
30. Bonneil, E. and K.C. Waldron, *Characterization of a solid-phase extraction device for discontinuous on-line preconcentration in capillary electrophoresis-based peptide mapping*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1999. **736**(1-2): p. 273-287.
31. Bonneil, E. and K.C. Waldron, *On-line system for peptide mapping by capillary electrophoresis at sub-micromolar concentrations*. *Talanta*, 2000. **53**(3): p. 687-699.
32. Licklider, L. and W.G. Kuhr, *Characterization of Reaction Dynamics in a Trypsin-Modified Capillary Microreactor*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(9): p. 1902-1908.

33. Licklider, L., W.G. Kuhr, M.P. Lacey, T. Keough, M.P. Purdon, and R. Takigiku, *Online Microreactors/Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry for the Analysis of Proteins and Peptides*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(22): p. 4170-4177.
34. Schoenherr, R.M., M. Ye, M. Vannatta, and N.J. Dovichi, *CE-Microreactor-CE-MS/MS for Protein Analysis*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(6): p. 2230-2238.
35. Ye, M., S. Hu, W.W.C. Quigley, and N.J. Dovichi, *Post-column fluorescence derivatization of proteins and peptides in capillary electrophoresis with a sheath flow reactor and 488 nm argon ion laser excitation*. Journal of Chromatography A, 2004. **1022**(1-2): p. 201-206.
36. Ye, M., S. Hu, R.M. Schoenherr, and N.J. Dovichi, *On-line protein digestion and peptide mapping by capillary electrophoresis with post-column labeling for laser-induced fluorescence detection*. Electrophoresis, 2004. **25**: p. 1319-1326.
37. Massolini, G. and E. Calleri, *Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: recent developments and analytical applications*. Journal of Separation Science, 2005. **28**: p. 7-21.
38. Mikkelsen, S.R. and E. Cortón, *Enzyme Kinetics*, in *Bioanalytical Chemistry*. 2004, John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA. p. 22.
39. Chelius, D., G. Xiao, A.C. Nichols, A. Vizel, B. He, T.M. Dillon, D.S. Rehder, G.D. Pipes, E. Kraft, A. Oroska, M.J. Treuheit, and P.V. Bondarenko, *Automated tryptic digestion procedure for HPLC/MS/MS peptide mapping of immunoglobulin gamma antibodies in pharmaceuticals*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **47**(2): p. 285-294.
40. Kuipers, B.J.H., E.J. Bakx, and H. Gruppen, *Functional region identification in proteins by accumulative-quantitative peptide mapping using RP-HPLC-MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(23): p. 9337-9344.
41. Leadbeater, L. and F.B. Ward, *Analysis of tryptic digests of bovine [beta]-casein by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1987. **397**: p. 435-443.
42. Migneault, I., C. Dartiguenave, J. Vinh, M.J. Bertrand, and K.C. Waldron, *Two glutaraldehyde-immobilized trypsin preparations for peptide mapping by capillary zone electrophoresis, liquid chromatography, and mass spectrometry*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2008. **31**(6): p. 789-806.
43. Licklider, L. and W.G. Kuhr, *Optimization of Online Peptide Mapping by Capillary Zone Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(24): p. 4400-4407.
44. Mingliang Ye, S.H.R.M.S.N.J.D., *On-line protein digestion and peptide mapping by capillary electrophoresis with post-column labeling for laser-induced fluorescence detection*. Electrophoresis, 2004. **25**(9): p. 1319-1326.
45. Forsman, A., xfc, U. etschi, J. Ekholm, and L. Rymo, *Identification of Intracellular Proteins Associated with the EBV-Encoded Nuclear Antigen 5 Using an Efficient TAP Procedure and FT-ICR Mass Spectrometry*. J. Proteome Res., 2008. **7**(6): p. 2309-2319.
46. Gatlin, C.L., G.R. Kleemann, L.G. Hays, A.J. Link, and J.R. Yates, *Protein Identification at the Low Femtomole Level from Silver-Stained Gels Using a New*

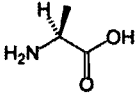
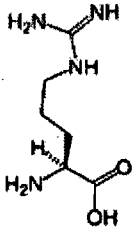
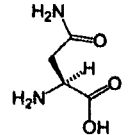
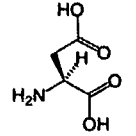
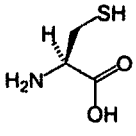
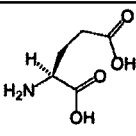
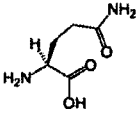
- Fritless Electrospray Interface for Liquid Chromatography-Microspray and Nanospray Mass Spectrometry*. Analytical Biochemistry, 1998. **263**(1): p. 93-101.
47. Green-Church, K.B. and J.J. Nichols, *Mass spectrometry-based proteomic analyses of contact lens deposition*. Molecular Vision, 2008. **14**: p. 291-297.
 48. Mann, M., R.C. Hendrickson, and A. Pandey, *ANALYSIS OF PROTEINS AND PROTEOMES BY MASS SPECTROMETRY*. Annual Review of Biochemistry, 2001. **70**(1): p. 437-473.
 49. Girard, M. *Étude qualitative et quantitative des interactions entre la β -lactoglobuline et la pectine en système dilué*. 2003 [cited 18 juillet 2008]; Available from: <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/c6f1a8de-2169-48fb-a91e-2162b28f9ebd/ch01.html>.
 50. Migneault, I., *Mémoire de maîtrise*, in *Chimie*. 2004, Université de Montréal: Montréal. p. 146.
 51. Proteowiki. *Désorption-ionisation laser assistée par matrice*. 2007 [cited; Available from: <http://www.univ-lille1.fr/master-proteomique/proteowiki/index.php/D%C3%A9sorption-ionisation+laser+assist%C3%A9e+par+matrice>.
 52. Elisemariou. *TOF-reflectron*. 2007 [cited; Available from: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:TOF-reflectron.png>.
 53. Hummel, B.C.W., *A Modified Spectrophotometric Determination of Chymotrypsin, Trypsin and Thrombin*. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959. **37**(12): p. 1393-1399.
 54. Beaven, G.H. and W.B. Gratzer, *Modification of the Enzymic Activity of Trypsin by Intramolecular Cross-Links*. International Journal of Peptide and Protein Research, 1973. **5**: p. 215-218.
 55. Santiagos, D., *Immobilisation de la trypsine inhibée en vue de l'utilisation de celle-ci pour la cartographie peptidique*. 2008, Université de Montréal: Montréal. p. 1-19.
 56. Torabi, S.-F., K. Khajeh, S. Ghasempour, N. Ghaemi, and S.-O.R. Siadat, *Covalent attachment of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase on perlite through silanization: Activity, stability and co-immobilization*. Journal of Biotechnology, 2007. **131**(2): p. 111-120.
 57. Mikkelsen, S.R. and E. Cortón, *Bioanalytical Chemistry*. 2004, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc. 71.
 58. Regan, D.L., P. Dunnill, and M.D. Lilly, *Immobilized Enzyme Reaction Stability: Attrition of the Support Material*. Biotechnology and Bioengineering, 1974. **XVI**: p. 333-343.
 59. Chui, W.K. and L.S. Wan, *Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres*. Journal of Microencapsulation, 1997. **14**: p. 51-61.
 60. Rho, K.S., L. Jeong, G. Lee, B.-M. Seo, Y.J. Park, S.-D. Hong, S. Roh, J.J. Cho, W.H. Park, and B.-M. Min, *Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing*. Biomaterials, 2006. **27**: p. 1452-1461.
 61. Sears, P.S. and D.S. Clark, *Comparison of Soluble and Immobilized Trypsin Kinetics: Implications for Peptide Synthesis*. Biotechnology and Bioengineering, 1993. **42**: p. 118-124.

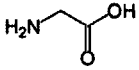
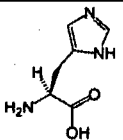
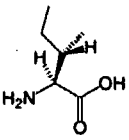
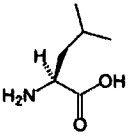
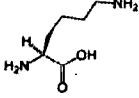
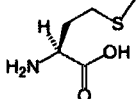
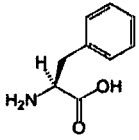
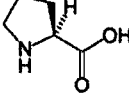
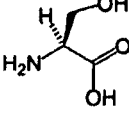
62. Walt, D.R. and V.I. Agayn, *The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde*. Trends in Analytical Chemistry, 1994. **13**: p. 425-430.
63. Nouaimi, M., K. Moschel, and H. Bisswanger, *Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers*. Enzyme and Microbial Technology, 2001. **29**(8-9): p. 567-574.
64. Lee, J.M., H.H.L. Edwards, C.A. Pereira, and S.I. Samii, *Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1996. **7**: p. 531-541.
65. Pelletier, J., *Désactivation des enzymes*, K.C. Waldron, Editor. 2008: Montréal.
66. Biemann, K., *Mass Spectrometry of Peptides and Proteins*. Annual Review of Biochemistry, 1992. **61**(1): p. 977-1010.
67. Tanizawa, K., S.-I. Ishii, K. Hamaguchi, and Y. Kanaoka, *Proteolytic Enzymes, VI. Aromatic Amidines as Competitive Inhibitors of Trypsin*. Journal of Biochemistry, 1971. **69**: p. 893-899.
68. Mares-Guia, M. and E. Shaw, *Studies on the Active Center of Trypsin, The Binding of Amidines and Guanidines as Models of the Substrate Side Chain*. Journal of Biological Chemistry, 1965. **240**: p. 1579-1585.
69. Krieger, M., L.M. Kay, and R.M. Stroud, *Structure and Specific Binding of Trypsin: Comparison of Inhibited Derivatives and a Model for Substrate Binding*. Journal of Molecular Biology, 1974. **83**: p. 209-230.
70. Bechet, J.-J. and A. D'Albis, *Binding of Competitive Inhibitors to the Different pH-Dependent Forms of Trypsin*. Biochimica et Biophysica Acta, 1969. **178**: p. 561-576.
71. Deutscher, M.P., *Maintaining Protein Stability*. Methods in Enzymology, 1990. **182**: p. 83-89.
72. Beynon, R.J. and J.S. Bond, *Inhibition of Proteinases*, in *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. 1990. p. 110-119.
73. Sipos, T. and J.R. Merkel, *Effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin*. Biochemistry, 1970. **9**(14): p. 2766-2775.
74. Fahimi, H.D., *Experiments in standardizing fixation with glutaraldehyde*. Journal of Microscopy, 1965. **4**.
75. Anderson, P., *Purification and quantitation of glutaraldehyde and its effect on several enzyme activities in skeletal muscle*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1967. **15**: p. 652-660.
76. Frigerio, N.A. and M.J. Shaw, *A Simple Method For Determination of Glutaraldehyde*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1969. **17**: p. 176-181.
77. Vilain, S., P. Cosette, R. Charlionet, M. Hubert, C. Lange, G.-A. Junter, and T. Jouenne, *Substituting Coomassie Brilliant Blue for bromophenol blue in two-dimensional electrophoresis buffers improves the resolution of focusing patterns*. Electrophoresis, 2001. **22**(20): p. 4368-4374.
78. Siva, R., G.J. Mathew, A. Venkat, and C. Dhawan, *An alternative tracking dye for gel electrophoresis*. Current Science, 2008. **94**(6): p. 765-767.
79. Pranaityte, B., A. Padarauskas, A. Dikčius, and R. Ragauskas, *Rapid capillary electrophoretic determination of glutaraldehyde in photographic developers using a cationic polymer coating*. Analytica Chimica Acta, 2004. **507**: p. 185-190.

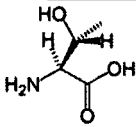
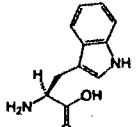
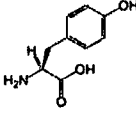
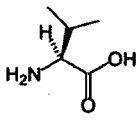
80. Costine, A. and S. Thurgate, *Iron adsorption on SiO₂/Si(111)*. Surface and Interface Analysis, 2007. **39**: p. 711-714.
81. Voivodov, K.I., B.P. Galunsky, and S.S. Dyankov, *Influence of Silanization Conditions on the Activity of Pepsin Immobilized on Silanized Silica Gel*. Journal of Applied Biochemistry, 1979. **1**: p. 442-447.
82. Plueddemann, E.P., *Adhesion Through Silane Coupling Agents*. The Journal of Adhesion, 1970. **2**(3): p. 184 - 201.
83. Blasi, L., L. Longo, P.P. Pompa, L. Manna, G. Ciccarella, G. Vasapollo, R. Cingolani, R. Rinaldi, A. Rizzello, R. Acierno, C. Storelli, and M. Maffia, *Formation and characterization of glutamate dehydrogenase monolayers on silicon supports*. Biosensors and Bioelectronics, 2005. **21**(1): p. 30-40.
84. Metwalli, E., D. Haines, O. Becker, S. Conzone, and C.G. Pantano, *Surface characterizations of mono-, di-, and tri-aminosilane treated glass substrates*. Journal of Colloid and Interface Science, 2006. **298**(2): p. 825-831.
85. Singh, A.K., A.W. Flounders, J.V. Volponi, C.S. Ashley, K. Wally, and J.S. Schoeniger, *Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports*. Biosensors and Bioelectronics, 1999. **14**(8-9): p. 703-713.
86. Ferreira, L., M.A. Ramos, J.S. Dordick, and M.H. Gil, *Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a Bacillus licheniformis protease (Subtilisin Carlsberg)*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **21**(4-6): p. 189-199.
87. Kim, J.-K., J.-K. Park, and H.-K. Kim, *Synthesis and characterization of nanoporous silica support for enzyme immobilization*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2004. **241**(1-3): p. 113-117.
88. Ettalibi, M. and J.C. Baratti, *Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized imulinases from aspergillus ficinum*. Enzyme and Microbial Technology, 2001. **28**(7-8): p. 596-601.
89. Greenberg, S.A., *The Chemisorption of Calcium Hydroxide by Silica*. J. Phys. Chem., 1956. **60**(3): p. 325-330.
90. Wikipedia. *Proteinogenic amino acid*. 2008 [cited 2008; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_standard_amino_acids].
91. Bode, W. and P. Schwager, *The Refined Crystal Structure of Bovine b-Trypsin at 1.8 Å Resolution, II. Crystallographic Refinement, Calcium Binding Site, Benzamidine Binding Site and Active Site at pH 7.0*. Journal of Molecular Biology, 1975. **98**: p. 693-717.
92. Huber, R., D. Kukla, W. Bode, P. Schwager, K. Bartels, J. Deisenhofer, and W. Steigeman, *Journal of Molecular Biology*, 1974. **89**: p. 73-101.
93. Hartley, B.S., *Amino-Acid Sequence of Bovien Chymotrypsinogen-A*. Nature, 1964. **201**: p. 1284-1287.
94. Braunitzer, G., R. Gehring-Muller, N. Hilschmann, K. Hilse, G. Hobom, V. Rudloff, and B. Wittmann-Liebold, *The constitution of normal adult human haemoglobin*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem, 1961. **325**: p. 283-286.

ANNEXES

Annexe A. Les 20 acides aminés naturels

Acide aminé	Structure [90]	Masse moyenne (Da)[2]	pK ₁ α-COOH[2]	pK ₂ α-NH ₃ ⁺ [2]	pK _R Chaîne latérale[2]
Alanine Ala A		71.1	2.35	9.87	
Arginine Arg R		156.2	1.82	8.99	12.48 (guanidino)
Asparagine Asn N		114.1	2.14	8.72	
Acide aspartique Asp D		115.1	1.99	9.90	3.90 (β-COOH)
Cystéine Cys C		103.1	1.92	10.70	8.37 (sulfhydryl)
Acide glutamique Glu E		129.1	2.10	9.47	4.07 (γ-COOH)
Glutamine Gln Q		128.1	2.17	9.13	

Glycine Gly G		57.0	2.35	9.78	
Histidine His H		137.1	1.80	9.33	6.04 (imidazole)
Isoleucine Ile I		113.2	2.32	9.76	
Leucine Leu L		113.2	2.33	9.74	
Lysine Lys K		128.2	2.16	9.06	10.54 (ϵ -NH ₃ ⁺)
Methionine Met M		131.2	2.13	9.28	
Phenylalanine Phe F		147.2	2.20	9.31	
Proline Pro P		97.1	1.95	10.64	
Serine Ser S		87.1	2.19	9.21	

Thréonine Thr T		101.1	2.09	9.10	
Tryptophane Trp W		186.2	2.46	9.41	
Tyrosine Tyr Y		163.2	2.20	9.21	10.46 (phénol)
Valine Val V		99.1	2.29	9.74	

Annexe B. Structures primaires des protéines utilisées

Trypsine bovine[91, 92]

IVGGYTCGAN TVPYQVSLNS GYHFCGGS LI NSQYVVSAAH CYKSGIQUVRL
 GEDNINVVEG NEQFISASKS IVHPSYNSNT LNNDIMLIK L KSAASLNSRV
 ASISLPTSCA SAGTQCLISG WGNTKSSGTS YPDVLKCLKA PILSNSSCKS
 AYPGQITSNM FCAGYLQGGK DSCQGDSGGP VVCSGKLQGI VSWGSGCAQK
 NKP GVYTKVC NYVSWIKQTIASN

Ponts disulfures : 7-137; 25-41; 109-210; 116-183; 148-162; 173-197

α -Chymotrypsine bovine[2, 93]

CGVPAIQPVL SGL IVNGE EAVPGSWPWQ VSLQDKTG FH FCGGSLINEN
 WVVTAAHCGV TTSDVVVAGE FDQGSSEKI QKLKIAKVFK NSKYNSLTIN
 NDITLLKLST AASFSQTVSA VCLPSASDDF AAGTTCVTTG WGLTRY AN
 TPDR LQQASL PLLSNTNCKK YWG TKIKDAM ICAGASGVSS MGDSSGGLV
 CKKNGAWTLV GIVSWGSS TC STSTPGVYAR VTALVN WVQQ TLAAN

Ponts disulfures : 1-122; 42-58; 136-201; 168-182; 191-221

Hémoglobine humaine adulte (HbA)[94]

Chaîne α

MVLSPADKTN VKAAWGKVGA HAGEYGAEAL ERMFLSFPTT
 KTYFPHFDLS HGSAQVKGHG KKVADALTNA VAHVDDMPNA
 LSALSDLHAH KLRVDPVNFK LLSHCLLVTL AAHLPAEFTP
 AVHASLDKFL ASVSTVLTSK YR

Chaîne β

MVHLTPEEKS AVTALWGKVN VDEVGGEALG RLLVVYPWTQ
 RFFESFGDLS TPDVVMGNPK VKAHGKKVLG AFSDGLAHL D
 NLKGT FATLS ELHCDKLHVD PENFRLLGNV LVCVLAHHFG
 KEFTPPVQAA YQKVVAGVAN ALAHKYH

Annexe C. Méthode utilisée pour la séparation des peptides par électrophorèse capillaire

	Évènement	Valeur	Durée	Solution
1	Rinçage-Pression	20.0 psi	3.00 min	HCl 0.1 M
2	Rinçage-Pression	20.0 psi	3.00 min	NaH ₂ PO ₄ 50 mM pH 2.5
3	Injection-Pression	0.5 psi	5.0 s	Échantillon
4	Attente		0.00 min	
5	Séparation-Voltage	15.0 kV	45.00 min	
6	Arrêt de données			
7	Rinçage-Pression	20.0 psi	1.00 min	NaOH 1 M
8	Attente		0.20 min	
9	Rinçage-Pression	20.0 psi	1.00 min	H ₂ O
10	Rinçage-Pression	20.0 psi	2.00 min	HCl 1 M
11	Fin			

Annexe D. Procédure optimale de la réticulation de la chymotrypsine avec le glutaraldéhyde

Un volume de 0.200 mL de la chymotrypsine 1.3 mM aq. a été ajouté à 1.485 mL d'une solution tampon de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM pH 5.5 dans un tube de centrifugation de 2.0 mL. Ensuite, 0.390 mL d'une solution de GA 2.5% a été ajoutée goutte par goutte dans le milieu réactionnel et le mélange a été laissé à t.p. pendant 2 h. Il a ensuite été centrifugé à $327 \times g$ (3000 rpm) pendant 2 min et 1.000 mL du surnageant a été prélevé. Les solides ont ensuite été lavés avec 3×1 mL de solution tampon, 3×1 mL de NaCl 500 mM et 3×1 mL de solution tampon. 1.000 mL de glycine 200 mM a ensuite été ajouté au mélange réactionnel et laissé à t.p. pendant 3 h. Le mélange final a été centrifugé à $327 \times g$ (3000 rpm) pendant 2 min, le surnageant a été prélevé et les solides ont alors été lavés avec 3×1 mL de solution tampon et 3×1 mL d'eau déionisée. La chymotrypsine réticulée a été gardée dans l'eau déionisée au réfrigérateur jusqu'à usage.